

Aus der Medizinischen Klinik IV,
Universitätsklinikum Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. D. Fliser

**REGULATION DER PHAGOZYTLOSELEISTUNG
UND T-ZELL-PROLIFERATION BEI
HÄMODIALYSEPATIENTEN**

**DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008**

**vorgelegt von: ELENA TZIGIANNIS
geb. am: 31.03.1978 in Saarbrücken**

**Gewidmet meinen Eltern
und meiner Oma Ruth †**

INHALTSVERZEICHNISS

INHALTSVERZEICHNISS	3
1 ZUSAMMENFASSUNG	9
1.1 Deutsche Zusammenfassung	9
1.2 Summary.....	11
2 EINLEITUNG	13
2.1 Das Immunsystem, unspezifische und spezifische Immunantwort.....	13
2.1.1 Unspezifische Immunantwort bei HD-Patienten.....	14
2.1.2 Phagozytose, als Bestandteil der unspezifische Immunantwort, bei HD-Patienten	15
2.1.3 Spezifische Immunantwort bei HD-Patienten	16
2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	17
2.3 Einfluss von Zytokinen.....	18
2.3.1 Zytokine.....	18
2.3.2 Interleukin-10, ein antiinflammatorisches Zytokin	18
2.3.3 Tumornekrosefaktor- α , ein proinflammatorisches Zytokin	20
2.4 Ziele der Arbeit.....	21
3 MATERIAL UND METHODIK.....	22
3.1 Geräte und Materialien	22
3.1.1 Probanden	22
3.1.2 Geräte, Klinik- und Laborbedarf	22
3.1.3 Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4 Primer für die IL-10 Genotypisierung	25
3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien	25

3.1.6	Materialien für die Durchflusszytometrie	26
3.1.7	Zytokine (IL-10; TNF- α)	27
3.1.8	Materialien für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	27
3.1.9	Materialien für die Bestimmung der T-Zellproliferation	29
3.2	Methoden	29
3.2.1	Isolierung der Leukozyten aus dem peripheren Blut	29
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl	30
3.2.3	Bestimmung der klinischen Laborparameter	31
3.2.4	Durchflusszytometrie – FACS-Analyse	31
3.2.5	Gating Strategie	34
3.2.6	Datenverarbeitung und statistische Auswertung	37
3.3	Studienablauf	37
3.3.1	Blutentnahme und Gewinnung von Plasma/Serum	37
3.3.2	Labelling von <i>Staph. aureus</i> mit BCECF-AM	37
3.3.3	Phagozytose-Assay	38
3.3.4	Temperaturabhängigkeit der Phagozytoseleistung im Vollblutassay	39
3.3.5	Stimulation der Zellen mit IL-10 und TNF- α im Vollblut über 24h	39
3.3.6	Phagozytoseleistung mit verschiedenen BCECF-AM gelabelten <i>Staph. aureus</i> Konzentrationen	39
3.3.7	Phagozytoseleistung mit verschiedenen IL-10 Konzentrationen	40
3.4	Phagozytoseleistung und Stimulation mit IL-10 und TNF- α	40
3.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies bei HD vs. Kontrollen	40
3.6	IL-10 Genotypisierung	41
3.6.1	Isolierung der DNA	41
3.6.2	Genotypisierung des Interleukin-10 mittels PCR	42

3.6.3	Gel-Elektrophorese	44
3.7	Proliferationsassay	45
3.7.1	Einsäen der PBMC in 96-U-well-Platte und Pulsen der Zellen mit ³ H-Thymidin	45
3.7.2	Erntevorgang im Zellharvester zur Analyse im MikroBeta Counter	45
4	ERGEBNISSE	47
4.1	Vorversuche	47
4.1.1	Einfluss der Temperatur auf die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten im Vollblut-Assay	47
4.1.2	Stimulation der Zellen mit IL-10 und TNF- α im Vollblut über 1h und 24h ...	48
4.1.3	Austesten der optimalen Konzentration an BCECF-AM gelabelten Staph. aureus im Phagozytoseassay	49
4.1.4	Austesten der optimalen IL-10 Konzentration im Phagozytoseassay	50
4.2	Messung der Phagozytoseleistung bei HD-Patienten im Vergleich zu einer gematchten nierengesunden Kontrollgruppe	51
4.3	ROS-Bildung in Bezug zur Phagozytoseleistung	53
4.3.1	Assoziation zwischen ROS-Bildung und der Phagozytoseleistung mittels Bestimmung der ROS-Bildung durch Spaltung von DHR123	53
4.3.2	Abhängigkeit der ROS-Bildung von der Phagozytoseleistung mittels Bestimmung der ROS-Bildung durch Spaltung von HE	54
4.3.3	Bildung von ROS: Vergleich der Messung durch DHR123-Spaltung mit der Messung durch HE-Spaltung	54
4.4	ROS-Bildung im Vergleich mit Kontrollpersonen	55
4.4.1	Bestimmung der ROS-Bildung mit DHR	56
4.4.2	Bestimmung der ROS-Bildung mit HE	57
4.4.3	To-Pro-3-Iodid positive Zellen bei HE und DHR	57

4.5	Einfluss des IL-10 Genotyps auf Phagozytoseleistung	58
4.6	Regulation der Phagozytoseleistung durch antiinflammatorisches IL-10.....	59
4.6.1	Einfluss von IL-10 auf die Phagozytoseleistung bei HD-Patienten und einer nierengesunden gematchten Kontrollgruppe	60
4.6.2	To-Pro-3-Iodid positive Zellen als Marker für nekrotische Zellen	62
4.7	Proliferations-Assay	64
4.7.1	T-Zell-Proliferation bei HD-Patienten im Vergleich zu einer nierengesunden Kontrollgruppe	65
4.7.2	Proliferation bei HD-Patienten im Vergleich zu einer gematchten Kontrollgruppe	65
5	DISKUSSION.....	67
5.1	Phagozytoseleistung bei HD-Patienten	67
5.2	Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies bei HD-Patienten.....	69
5.3	IL-10 Genotyp und Einfluss des antiinflammatorischen IL-10 auf die Phagozytoseleistung bei HD-Patienten	70
5.4	T-Zellproliferation bei HD-Patienten	72
6	LITERATURVERZEICHNISS.....	75
7	DANK.....	84
8	LEBENS LAUF.....	85

Verzeichnis der Abkürzungen und Termini technici

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	Aqua destillata – destilliertes Wasser
ARMS	amplification refractory mutation system
BCECF-AM	2',7'-BIS (2-Carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluorescein Acetoxymethylester
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation – System zur Bezeichnung zellulärer Differenzierungsantigene
Cl ⁻	Chlorid - Ionen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dest.	destilliert
DHR	Dihydrorhodamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometer
Fc	Fragment cristalline – kristallisierbares Antikörperfragment des konstanten Teils der schweren Immunglobulinkette
FCS	foetal calf serum, foetales Kälberserum
FSC	forward scatter
HD	Hämodialyse
HE	Hydroethidin
Hep	Heparin
³ H-Thymidin	Tritium-Thymidin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
Li	Lithium
LPS	Lipopolysaccharid

MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
MW	arithmetischer Mittelwert
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanion
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphat buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
pH	pondus Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
ROS	reactive oxygen species – reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute, Umdrehungen in der Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation, Standardabweichung
SNP	single nucleotid polymorphism
SSC	sideward scatter
Staph. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
Syn.	Synonym
Tab.	Tabelle
TH	T-Helferzellen
TNF- α	Tumor necrosis factor α – Tumornekrosefaktor α
UL	Upper left
UR	Upper right
USRDS	United States Renal Data System
UV	Ultraviolett
VB	Vollblut
vs.	versus

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Deutsche Zusammenfassung

Hämodialysepatienten weisen eine hohe Inzidenz an Infektionen und damit verbundenen Komplikationen auf. Eine gestörte, urämie-/dialyse-assoziierte Immunkfunktion bei Hämodialysepatienten wird oft mit erhöhter Morbidität und Mortalität ursächlich in Verbindung gebracht. 13,5% der Todesursachen werden durch bakterielle Infektionen verursacht. Die Gründe für dieses erhöhte Risiko sind bisher noch nicht komplett geklärt und scheinen multifaktoriell bedingt zu sein. Eine gestörte spezifische und unspezifische Immunkfunktion sowie der Einfluss von Zytokinen bei Hämodialysepatienten wurde bereits mehrfach in der Literatur untersucht und diskutiert. Im Zuge des verbesserten Qualitätsmanagements, das biokompatiblere Filtermembranen und bessere Dialysewasserqualität einschliesst, stellt sich die Frage, inwiefern sich diese Verbesserungen auf die Immunkfunktion der Patienten auswirken. Es soll die Frage beantwortet werden, ob Hämodialysepatienten, wie in älteren Studien propagiert, eine eingeschränkte Immunantwort aufweisen.

Zur Beurteilung der unspezifischen Immunabwehr bei Hämodialysepatienten bestimmten wir die Phagozytoseleistung sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies mittels einer spezifischen durchflusszytometrischen Analyse. Als Mass für die Beurteilung der Phagozytoseleistung untersuchten wir die potentielle Aufnahme/Phagozytose von exogen angebotenen BCECF-AM gelabelten *Staph. aureus*. Wir wählten den Einsatz von *Staph. aureus*, da im Vergleich zu anderen bereits untersuchten Keimen *Staph. aureus* klinisch einen grossen Anteil der Infektionen bei Hämodialysepatienten verursacht. Methodisch zeigte sich der Vorteil der durchflusszytometrischen Analyse darin, dass direkt der Anteil der Granulozyten sowie Monozyten im Vollblut gemessen werden kann. Damit werden zum einen die phagozytierenden Zellen sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies direkt erfasst und zum anderen äussere Einflüsse durch Zellisolierungen ausgeschaltet. Da das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10 eine grosse Rolle bei der Immunabwehr spielt, und die Niereninsuffizienz zu veränderten Zytokinspiegeln und Wirkungen führt,

untersuchten wir den Interleukin-10-Genotyp in Bezug zur Phagozytoseleistung. Zur Analyse des Interleukin-10-Gen-Polymorphismus wurde eine ARMS-PCR (“amplification refractory mutation system”) verwendet. Da die Untersuchung an einem relativ kleinen Kollektiv zur Beurteilung des Interleukin-10-Polymorphismus stattfand, untersuchten wir zusätzlich den direkten Einfluss von Interleukin-10 auf die Phagozytoseleistung. Zumal wir neben der unspezifischen auch die spezifische Immunabwehr beurteilen wollten, bestimmten wir mittels eines Thymidins-Assays die T-Zell-Proliferation. Das Probandenkollektiv umfasste Hämodialysepatienten sowie eine nach Alter, Geschlecht sowie Prävalenz von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gematchte nierengesunde Kontrollgruppe.

Sowohl bei der Phagozytoseleistung, der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies als auch der T-Zell-Proliferation zeigten sich bei den Hämodialysepatienten vergleichbare Ergebnisse zu dem Kontrollkollektiv, so dass wir in vitro keine Einschränkungen der unspezifischen als auch der spezifischen Immunantwort bei Hämodialysepatienten nachweisen konnten. Einen Einfluss des antiinflammatorischen Interleukin-10 auf die Phagozytoseleistung konnten wir nicht zeigen. Um mögliche Unterschiede auch sicher auf die Niereninsuffizienz beziehen zu können, wurden beide Gruppen für Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskuläre Ereignisse gematched.

Offen bleibt allerdings, ob Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen zwar gleichwertige Ergebnisse der Immunantwort in vitro zeigen, diese aber in vivo nicht adäquat umgesetzt werden kann und Krankheitserreger nicht vollständig eliminiert werden können. Abschliessend lassen die Verbesserung der Dialysequalität aber auch die These zu, dass dies zu Verbesserungen sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems bei Hämodialysepatienten geführt haben könnte und somit die Immunantwort bei Hämodialysepatienten im Vergleich zu früheren Jahren weniger beeinträchtigt ist.

1.2 Summary

Hemodialysis patients exhibit a high incidence of infections and associated complications. A disturbed uremic-/dialysis associated immune function in hemodialysis patient is often related to an increased morbidity and mortality. In hemodialysis patients 13.5 % of deaths are caused by bacterial infections. The reasons for this increased risk are so far not yet completely clarified and seem to be multifactorially conditioned. A disturbed specific and nonspecific immune function as well as the influence of cytokines were studied by several investigations in the literature. In the course of the improved quality management, which includes biocompatible filter membranes and better dialysis water quality, the question arises, to what extent these improvements affect the immune function of the patients. The question is to be answered, whether hemodialysis patients, as in older studies, still exhibit a reduced immune answer.

For the evaluation of the nonspecific immune defense in hemodialysis patients we studied the phagocytosis activity, as well as the synthesis of reactive oxygen species using a specific flow cytometric analysis. Phagocytosis activity was examined by measuring the absorption of exogenously offered BCECF-AM labeled staph. aureus. We selected the use of staph. aureus, because compared with other germs in previous studies, staph. aureus causes a large fraction of infections in hemodialysis patients. Methodically the advantage of the flow cytometric analysis showed up in the fact that granulocytes and monocytes can be measured and compared in whole blood specimens. This technique allows the quantification of both phagocytosis and production of reactive oxygen species without the need of cell separation that might influence cellular function by itself. Because the anti-inflammatory interleukin-10 plays an important role in the immune defense, and the renal insufficiency leads to changes in cytokine levels and effects, we examined the interleukin-10 genotype with regard to the phagocytosis activity. This was done by the use of an ARMS-PCR ("amplification refractory mutation system"). Because the investigation took place in a relatively small cohort, we additionally examined the direct influence of interleukin-10 on phagocytosis activity. Because we also intended to evaluate the specific in addition to the non-specific immune defense, we determined the T-cell-proliferation

using a thymidin-assay. The study comprised hemodialysis patients as well as a healthy control group matched for age, sex, prevalence of diabetes mellitus and cardiovascular disease.

The phagocytosis activity as well as reactive oxygen species synthesis and T-cell-proliferation were comparable between the control collective and the hemodialysis patients. That means that we could not prove a reduction of the nonspecific and the specific immune response in vitro within hemodialysis patients. The anti-inflammatory cytokine IL-10 did not have a significant influence on phagocytosis. In order to exclude confounders between patients and controls, both groups were matched for age, sex, prevalence of diabetes mellitus and cardiovascular disease.

Our data leave the possibility that in vitro test in patients with chronic renal disease show equivalent results compared to healthy controls while the defensive action cannot effectively act on pathogens in vivo.

Finally the improvements of the dialysis quality allow the hypothesis that this led to improvements of the nonspecific and the specific immune system of hemodialysis patients and thus the immune answer is less reduced than documented by earlier publications.

2 EINLEITUNG

Eine gestörte, urämie-/dialyse-assoziierte Immunfunktion bei Hämodialysepatienten wird oft mit erhöhter Morbidität und Mortalität ursächlich in Verbindung gebracht und ist vielfach klinisch und experimentell untersucht und dokumentiert worden. Im Zuge des verbesserten Qualitätsmanagements, das biokompatiblere Filtermembranen und bessere Dialysewasserqualität einschliesst, stellt sich die Frage, inwiefern sich diese Verbesserungen auf die Immunfunktion der Patienten auswirken.

Schon 1968 berichtete Montgomery et al über eine 60%ige Inzidenz von Infektionen bei hospitalisierten Patienten mit chronischer Nierenerkrankung, die bei 38% zum Tode führte. Sarnak et al berichtete 2000 über eine mehr als 100-fach erhöhte Sterblichkeit durch Sepsis bei US-amerikanischen Hämodialysepatienten gegenüber der Allgemeinbevölkerung. Die unangepasste Mortalitätsrate für alle Dialysepatienten zwischen 2003 und 2005 betrug in den USA 229,2 Tode auf 1000 Patientenjahre. Die Mortalitätsrate durch Infektionen betrug dabei 13,5% (USRDS, 2007). Obwohl die Inzidenz abgenommen hat, sind Infektionen weiterhin ein häufiger Grund für Erkrankungen und Tod bei chronischen Dialysepatienten.

2.1 Das Immunsystem, unspezifische und spezifische Immunantwort

Der menschliche Organismus verfügt über verschiedene Mechanismen, um sich gegen Erreger, infizierte und veränderte Zellen zu schützen. Für diese Abwehrmechanismen ist das Immunsystem verantwortlich. Unter dem Immunsystem versteht man ein komplexes System zur Abwehr körperfremder Substanzen und kontinuierlicher Elimination anomaler Körperzellen. Daran beteiligt sind die Organe des lymphatischen Systems, im gesamten Organismus verteilte Zellen (v.a. Leukozyten, Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems) und Moleküle wie Immunglobuline oder Zytokine.

Immunantwort unterteilt zum einen in die unspezifische Immunantwort und zum anderen in die spezifische Immunantwort. Diese bilden zusammen ein sehr wirksames Abwehrsystem, das, wenn es intakt ist, dafür sorgt, dass wir nur verhältnismässig selten krank werden, obwohl wir ständig einer Fülle von Krankheitserregern ausgesetzt sind.

Allerdings werden die Zellen des Immunsystems bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sowohl durch urämisch-toxische Effekte als auch durch Behandlungsmethoden, besonders die Dialyse, beeinflusst. Die erhöhte Anfälligkeit von Hämodialysepatienten gegenüber Infektionen und Entzündungen lässt sowohl eine gestörte unspezifische als auch spezifische Immunantwort bei diesen Patienten erwarten.

Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen ohne Infektionen weisen meistens normale Leukozytenzahlen auf, allerdings wurde auch eine leichte Lymphopenie und eine Monozytose berichtet. Während Infektionen ist die entstehende Lymphozytose bei diesen Patienten häufig sehr gering bis fehlend. Allerdings kann die Lymphopenie nicht ausreichend die reduzierte zelluläre Immunantwort erklären, da die Zellzahlen sich im niedrig- bis fast normalen Bereich bewegen (Girndt, 2001).

2.1.1 Unspezifische Immunantwort bei HD-Patienten

Granulozyten, Monozyten und Makrophagen sind funktionell wichtige zelluläre Bestandteile der angeborenen unspezifischen Immunantwort, welche Antigen phagozytieren und inflammatorische Mediatoren freisetzen. Die löslichen Komponenten der angeborenen Immunantwort beinhalten das Komplementsystem, Zytokine und eine Vielzahl weiterer Mediatoren (z.B. Proteasen, Prostaglandine).

Granulozyten, die man auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet, umfassen ca. 60-70% der Blutleukozyten. Die Lebensdauer der Granulozyten beträgt 2-3 Tage, die Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden Granulozyten 6-7 Stunden. Es gibt drei Arten von Granulozyten: die neutrophilen (über 90%), die eosinophilen (2-4%) und die basophilen (1%) Granulozyten. Die Aufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht in der Phagozytose von (opsonisierten) Mikroorganismen, virusinfizierten Zellen, Tumorzellen und körperfremden Antigenen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der akuten nichtinfektiösen und bakteriellen Entzündung und nehmen eine zentrale Stellung im Immunsystem bei der Abwehr von Mikroorganismen ein.

Monozyten sind die zu den Leukozyten gehörenden grössten mononukleären Zellen im Blut (\varnothing 12-20 μ m). Sie sind zur Phagozytose und Migration befähigt und besitzen auf ihrer Membranoberfläche u.a. Rezeptoren für Komplementproteine (z.B. C3b) sowie Fc-Rezeptoren für IgG (wichtig für Anlagerung und Phagozytose von Mikroorganismen).

Die hohe Frequenz von bakteriellen Infektionen bei Hämodialysepatienten lässt erwarten, dass eine Funktionsstörung der Granulozyten kausal an der gestörten Immunantwort beteiligt ist, da Granulozyten die Hauptzellen der unspezifischen Abwehr gegenüber Bakterien sind. Faktoren, die zu einer gestörten Funktion der Granulozyten führen sind bisher nicht vollständig geklärt und wurden u.a. der Mangelernährung, Eisenüberladung, urämischen Toxinen, Zinkmangel, erhöhten Calciumspiegeln u.a. bei sekundärem Hyperparathyreoidismus, einem Granulozyten inhibierendem Protein – GIP - (Cohen, 1997) oder der Dialyse an sich zugeschrieben.

2.1.2 Phagozytose, als Bestandteil der unspezifische Immunantwort, bei HD-Patienten

Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme fester Partikel (z.B. Gewebetrümmer, Fremdkörper, Mikroorganismen) in das Zellinnere von Phagozyten mit anschliessendem intrazellulärem enzymatischem, oxidativem Abbau. Nach Anlagerung an die Zellmembran (z.B. von opsonisierten Mikroorganismen durch Bindung an membranständige Fc- und Komplementrezeptoren) kommt es zur Aktivierung kontraktile Strukturen innerhalb des Zytoplasmas mit Einschluss der Partikel in Zytoplasmavakuolen durch lokale Einstülpung der Zellmembran bzw. Ausformung von zellulären, die Partikel umfliessenden Pseudopodien.

Eine gestörte Phagozytoseleistung bei Hämodialysepatienten wird des öfters diskutiert und als Ursache der gehäuften Zahl von Infektionen gesehen. Sharon et al beschreibt bereits 1987 in ihrer Übersichtsarbeit kontroverse Ansichten, da sowohl Arbeiten über eine normale als auch über eine verminderte Phagozytoseleistung vorhanden sind. Während z.B. Ruiz et al 1990 zeigte, dass die Funktion des Fc- γ Rezeptors bei Makrophagen beeinträchtigt ist und dies wahrscheinlich zu vermehrten Infektionen bei HD-Patienten führt, konnte Halma et al 1992 in Ihrer Studie zeigen, dass die Fc- γ Rezeptor Funktion bei HD-Patienten nicht beeinträchtigt ist. Bis zum aktuellen Zeitpunkt sind die Ansichten noch sehr kontrovers, da viele Mechanismen noch nicht endgültig geklärt sind.

2.1.3 Spezifische Immunantwort bei HD-Patienten

Für die antigenspezifische Immunantwort sind vor allem die Lymphozyten (T- und B-Zellen) verantwortlich. Die spezifische Immunantwort des erworbenen Immunsystems wird überwiegend durch Lymphozyten und spezifische Antikörper vermittelt.

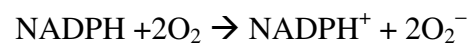
Lymphozyten sind von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark abstammende, in Knochenmark, Lymphknoten, Thymus und Milz gebildete und hauptsächlich über die Lymphbahnen ins Blut gelangende kleine weiße Blutkörperchen. In Abhängigkeit von ihrer Funktion werden B-Lymphozyten und T-Lymphozyten unterschieden. Die Reifung der B-Lymphozyten erfolgt im Knochenmark, die der T-Lymphozyten im Thymus. B-Lymphozyten sind Träger der spezifisch-humoralen Immunität und Vorläufer der Plasmazellen, die Antikörper freisetzen. T-Lymphozyten sind die Träger der zellvermittelten Immunität. Die T-Lymphozyten bilden zwei Klassen, von denen eine bei der Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen wird, die virusinfizierte Zellen abtöten. Die zweite Klasse umfasst T-Helfer-Zellen, die wiederum andere Zellen wie B-Zellen oder Makrophagen aktivieren.

Es gibt zwei Wege, die zu einer B-Zell-Aktivierung und dann folgenden Antikörper Produktion führen. Viele Antigene werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) verarbeitet und den T-Helferzellen präsentiert. Diese interagieren mit den B-Zellen und induzieren eine Immunantwort. Die Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Helferzellen ist relativ stör anfällig. Frühere Studien zeigten, dass 40% der Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen keine adäquate Antwort auf Standardimpfungen zeigten. Impfungen mit Hepatitis B (Köhler, 1984), Influenza (Rautenberg, 1989), Tetanus (Girndt, 1995) und Diphtherie (Kreft, 1997) zeigen eine schlechtere Impfantwort als Impfungen mit Polysaccharid Antigenen wie Pneumokokken (Friedman, 1980). Dies könnte daran liegen, dass bakterielle Antigene, wie z.B. Polysaccharid Antigene direkt B-Zellen zur Antikörper-Produktion aktivieren und unabhängig von der stör anfälligen Interaktion zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Helferzellen ist. Bei Nierenkranken hat dies eine bessere Immunantwort zur Folge und lässt vermuten, dass Immundefekte eher auf Störungen der T-Zell-Funktion bzw. Proliferation, oder der APC als der B-Zell-Funktion zurückzuführen sind (Girndt, 2002).

2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Eine wichtige funktionelle Eigenschaft der neutrophilen Granulozyten ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als Abwehrmechanismus von Infektionen. Ein Defekt der ROS-Produktion bei Hämodialysepatienten als Antwort auf Infektionen wurde bereits beschrieben.

Die Bildung der ROS erfolgt nach entsprechender Stimulation innerhalb von Sekunden in einer explosionsartigen Kaskade, dem sogenannten „respiratory burst“ (Syn.: „metabolic burst“, „oxidative burst“). Dabei kommt es zu einer erhöhten Aktivität der membranständigen NADPH-abhängigen Oxidase, dem Schlüsselenzym der Sauerstoffradikalbildung von Granulozyten. Diese Flavinoxidase katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff (O_2) zum Superoxidanion (O_2^-) (Löffler, 1998).



Es führt dann weiter durch Radikal-Kettenreaktionen zur Produktion anderer, bakterizid wirkender ROS. Das Superoxidanion wird durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid reduziert oder kann mit bereits gebildetem Wasserstoffperoxid und der Bildung hochaktiver Hydroxylradikale reagieren. Es handelt sich bei diesen um hochreaktive, keimtötende Agenzien, die Enzyme oder Membranbestandteile oxidieren und somit funktionell inaktivieren können.

In geringen Konzentrationen sollen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als physiologische Mediatoren der Immunantwort wirken, während höhere Konzentrationen mit verschiedenen Formen von Zellschäden in Verbindung gebracht werden. Erhöhte ROS-Konzentrationen sollen in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen involviert sein, u.a. der Artherosklerose, Diabetes mellitus, Hypertonie und chronische entzündlichen Erkrankungen (Tepel, 2000).

Bereits 1987 beschrieben Sharon et al in ihrer Übersichtsarbeit, dass sowohl Arbeiten über eine erhöhte, normale als auch über eine verminderte ROS-Bildung vorhanden sind. Auch relativ aktuelle Arbeiten zeigen diese Kontroverse. So konnte z.B. Anding et al 2003 eine vergleichbare ROS-Bildung von HD-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen zeigen,

während Sardenberg et al 2005 von einer verminderten Bildung ROS bei HD-Patienten berichtet.

2.3 Einfluss von Zytokinen

2.3.1 Zytokine

Zytokine (z.B. Lymphokine, Interleukine, Monokine, Wachstumsfaktoren) sind wesentliche Mediatoren der Immunantwort und Entzündungsreaktion. Zusätzlich sind sie noch in viele andere biologische Reaktionen involviert. Zytokine sind kleine Proteine (~25kDa), die im Körper von verschiedenen Zellen, normalerweise als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz, freigesetzt werden und ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf ihre Zielzellen ausüben (Janeway, 2002). Die Bindung an den Rezeptor löst in der betroffenen Zelle verschiedene Veränderungen aus, wie zum Beispiel Wachstum, Differenzierung oder den Tod der Zelle. Man unterscheidet zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. Es wird diskutiert, dass Blutkontakt mit der Dialysemembran während der Dialyse zu veränderten Spiegeln von entzündungsassoziierten Zytokinen und Akut Phase Proteinen führt.

2.3.2 Interleukin-10, ein antiinflammatorisches Zytokin

Interleukin-10 (IL-10) ist ein 18kDA schweres Polypeptid, das aus 160 Aminosäuren besteht. Die biologisch aktive Form ist ein Homodimer, das sich aus zwei nicht kovalent gebundenen Einheiten zusammensetzt (Windsor, 1993). Die native Form des IL-10 liegt nicht glykolisiert vor. Das IL-10 Gen ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und wird durch 5 Exons kodiert (Kim, 1992). Die IL-10-Expression wird sowohl auf transkriptioneller Ebene, als auch durch die Kontrolle der mRNA Stabilität auf posttranskriptioneller Ebene reguliert (Powell, 2000).

IL-10 wurde ursprünglich als „Cytokine Synthesis Inhibitory Factor“ (CSIF) beschrieben, der von Maus-T-Helfer-2-Zellen gebildet wird und die Zytokinproduktion von T-Helfer-1-Zellen inhibiert (Fiorentino, 1989). Kurze Zeit später wurde das humane Homolog

beschrieben. Auch in Epstein-Barr-Viren wurde ein IL-10-homologes-Gen entdeckt, dessen Produkt ähnlich wirkt wie IL-10 selbst (Moore, 1990; Siegenthaler, 2001). Mittlerweile hat sich gezeigt, dass IL-10 von einer Reihe von Immunzellen gebildet wird, von Monozyten, Makrophagen, von T-Helfer-Zellen, von aktivierten B-Zellen, und dendritischen Zellen. Zu den Zielzellen von IL-10 gehören eine Vielzahl von Zellen: APCs (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen), T-, B- und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), Mastzellen und Eosinophile.

Das antiinflammatorische IL-10 spielt eine Hauptrolle bei der unspezifischen zellulären Immunantwort. IL-10 hemmt die zelluläre Entzündungsreaktion durch Unterdrückung der MHC-II-Expression (Major Histocompatibility Complex) und fährt die Entzündungsreaktion zurück, nachdem das Pathogen eliminiert wurde. In diesem Zusammenhang kommt es zu einer Reduktion der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-1, Chemokinen oder IL-12 (de Waal, 1991; Siegenthaler, 2001). Um dies zu erreichen, kommt es zur Sekretion von IL-10 einige Stunden nachdem die proinflammatorischen Faktoren von den selben Zellen produziert wurden (Girndt, 2002).

HD-Patienten mit einer guten Immunfunktion scheinen eine höhere Sekretion von IL-10 zu zeigen (Girndt, 1995; Brunet, 1998), während HD-Patienten mit eingeschränkter Immunfunktion eher nicht in der Lage zu sein scheinen, ihre IL-10 Synthese zu erhöhen, um eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder TNF- α zu verhindern (Girndt, 1995). 20-30% der HD-Patienten können anscheinend nicht effektiv eine Entzündung kompensieren (Girndt, 2002). Diese Patienten haben eine schlechtere Gesamtprognose, eine schlechtere Immunfunktion und eine höhere kardiovaskuläre Sterblichkeit.

Auf Grund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes kann IL-10 von verschiedenen Personen unterschiedlich hoch reguliert werden (Turner, 1997). Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Immunantworten z.B. auf Hepatitis B Impfungen (Girndt, 2001) mit unterschiedlichen IL-10 Genotypen assoziiert sind. Polymorphismen im Zytokin-Gen Promoter beeinflussen die Menge der Sekretion von IL-10. Girndt et al konnten feststellen, dass Patienten mit dem Allel -1082G*, welches mit einer höheren IL-10 Produktion assoziiert ist, häufiger eine bessere Impfantwort auf eine Impfung mit Hepatitis B zeigten als Personen die weniger IL-10 produzieren. Dies lässt vermuten, dass Personen die aufgrund ihrer genetischen Veranlagung weniger IL-10

produzieren und eine Nierenerkrankung entwickeln, ein erhöhtes Risiko für Immundefekte und chronische Infektionen besitzen. Diese Arbeit unterstützt damit die These, dass IL-10 eine Rolle in der Pathogenese von Immundefekten bei Hämodialysepatienten spielt.

2.3.3 Tumornekrosefaktor- α , ein proinflammatorisches Zytokin

Der Tumornekrosefaktor TNF- α (17kDa) besteht aus 157 Aminosäuren und ist ein proinflammatorisches Zytokin. Er ist der Hauptmediator der Wirtsabwehr gegen gramnegative Bakterien und ist wichtig für die intrazelluläre Abtötung von Bakterien, besonders auch von Mykobakterien. TNF- α wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen, aber auch stimulierten T-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen freigesetzt.

TNF- α ist bei einer Vielzahl von Reaktionen im Körper beteiligt. In geringen Mengen bewirkt TNF- α u.a. die Aktivierung von Neutrophilen und stimuliert Monozyten/Makrophagen zur Zytokinproduktion. In grösseren Mengen produziert, wird es systemisch wirksam und hat hormonähnliche Effekte. Es induziert Fieber (endogenes Pyrogen), erhöht die IL-6 und IL-1 Produktion in Monozyten und ist mit diesen besonders für die gesteigerte Produktion von Akutphaseproteinen durch die Leber verantwortlich. Ausserdem hemmt es die Gerinnung, unterdrückt Stammzellen im Knochenmark und kann langfristig verabreicht zu einer Kachexie (ursprünglicher Name Kachektin) führen (Siegenthaler, 2001).

Plasma TNF- α Level bei Hämodialysepatienten zeigen gegenüber der Allgemeinbevölkerung signifikant erhöhte Werte (Herbelin, 1990; Descamps-Latscha, 1994; McKenna, 1994; Macdonald, 1993; Knerr, 2005). Die Anwesenheit von dauerhaft erhöhten TNF- α Werten lässt eine permanente Aktivierung des inflammatorischen Systems vermuten.

2.4 Ziele der Arbeit

Hämodialysepatienten weisen trotz stetiger Verbesserung der Therapie auch heute noch eine hohe Inzidenz an Infektionen mit verschiedenen Komplikationen und erhöhter Morbidität und Mortalität auf. In diesem Zusammenhang wird ein gestörtes Immunsystem als Ursache diskutiert. Phagozytose, Einfluss von Zytokinen, ROS-Bildung und T-Zell-Proliferation sind wichtige Mechanismen der Immunfunktion. Vor allem ältere Studien berichten über eine gestörte Phagozytoseleistung bei HD-Patienten, während andere Studien dies in ihren Untersuchungen nicht nachvollziehen konnten. Ähnlich kontroverse Diskussionen ergeben sich bei der Untersuchung der ROS-Bildung wie auch der T-Zell-Proliferation. Ebenso stellt sich der Einfluss von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in der Literatur nicht einheitlich dar. Im Zuge des verbesserten Dialysequalität stellt sich die Frage, inwiefern sich die Immunfunktion der Hämodialysepatienten verändert hat.

Dies hat uns dazu veranlasst, die unspezifische und spezifische Immunfunktion bei HD-Patienten in vitro näher zu untersuchen. In dieser Doktorarbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- a) Haben Hämodialysepatienten unter der aktuellen, modernen Therapie eine veränderte Phagozytoseleistung als Bestandteil der unspezifischen Immunantwort?
- b) Haben Hämodialysepatienten eine veränderte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies?
- c) Welchen Einfluss hat das antiinflammatorische Zytokin Interleukin-10?
- d) Haben Hämodialysepatienten eine veränderte T-Zell-Proliferation als Bestandteil der spezifischen Immunantwort?

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Probanden

Granulozytäre und monozytäre Phagozytosefähigkeit sowie T-Zell-Proliferation wurden bei Hämodialysepatienten sowie nierengesunden Kontrollpersonen untersucht. Bei den Hämodialysepatienten handelt es sich um 54 Patienten mit einem mittleren Alter von $65,63 \pm 13,26$ Jahren, 30 männlich und 24 weiblich. Die mittlere Dialysezeit betrug $2,43 \pm 2,63$ Jahre. Als Dialysemembranen wurden verwendet: synthetische Polysulfonmembranen (F8, n=11 und F60, n=5), Polyamid-Membranen (Polyflux 210H, n=18) und Hämophan-Membranen vom Typ GFS 20 (n=20). Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um 18 Patienten der Augenklinik Homburg im mittleren Alter von $64,1 \pm 15,4$ Jahren, 10 männlich und 8 weiblich, die aufgrund ophthalmologischer Erkrankungen stationär behandelt wurden und keine Nierenkrankheit aufwiesen. Dialysepatienten und Nierengesunde wurden für Alter, Geschlecht sowie Prävalenz von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gematcht.

Manifeste kardiovaskuläre Ereignisse werden definiert durch das Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung (Herzinfarkt, koronare Bypassoperation, Dilatation oder Stentung von Koronararterien), einer zerebrovaskulären Erkrankung (Apoplex, Carotis-Thrombendarteriektomie) oder einer peripheren arteriellen Verschlusskrankung (Amputation, periphere Bypassoperation, Dilatation oder Stentung von Becken-Beinarterien).

3.1.2 Geräte, Klinik- und Laborbedarf

GERÄTE

Brutschrank

Heraeus Instruments, Hanau

Digitalkamera DC120 Zoom

Kodak, Stuttgart

Durchflusszytometer	Becton-Dickinson, Heidelberg
Eisflockenmaschine (Scotsman)	Tepa, Barsbüttel
Flachbett Gelkammer	UniEquip, Martinsried
Gefrierschrank -20°C	Bosch, Einzelhandel
Gilson Kolbenhubpipetten	Abimed, Langenfeld
Hybaid-PCR Express	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Kühlschrank +4°C	Liebherr, Einzelhandel
Laborwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau
MikroBeta Counter	Wallace, Freiburg
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	Goldstar, Einzelhandel
Neubauer Zählkammer	Fisher Scientific, Schwerte
pH-Meter CG 825	Schott, Mainz
Pipetboy plus	Integra Biosciences, Fernwald
Standautoklav 2540 EL	Systec, Wettenberg
Sterile Werkbank HB2472	Heraeus Instruments, Hanau
Transiluminator 312nm	Bachofer, Reutlingen
Vortex Mixer	NeoLab, Heidelberg
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasseraufbereiter MilliQ UF plus	Millipore, Eschborn
Zellharvester	Berthold, Bad Wildbad
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien

REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua injectabile	Braun, Melsungen
BCECF-AM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Roth, Karlsruhe

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTP Mix (Standard) (10mM)	PeqLab, Erlangen
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
EtBr (Ethidiumbromid) 1%	Merck, Darmstadt
FACS Flow	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS Lysing Solution	Becton-Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton-Dickinson, Heidelberg
FCS (fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Cölbe
Ficoll	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutamin 1%	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Hot StarTaq DNA Polymerase Set	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ (25mM) (Magnesiumchlorid)	Merck, Darmstadt
PBS (phosphate buffered saline)	Linearis, Wertheim-Bettingen
PenStrep 1% (Penicillin Streptomycin)	Biochrom, Berlin
PHA (Phytohämagglutinin)	Biochrom, Berlin
Qiagen DNA Blood Mini Kit(50)	Qiagen, Hilden
RPMI	Biochrom, Berlin

VERBRAUCHSMATERIALIEN

0,5 ml Reaktionsgefäße	NeoLab, Heidelberg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand, Wertheim
15 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
50 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Einmal-Plastikpipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Corning Costar, Wiesbaden
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filterpipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 1000µl)	Greiner, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer	Roth GmbH, Karlsruhe
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Greiner, Frickenhausen

Sheath Fluid	Dako Cytomation, Hamburg
96-well Rundbodenplatte	Greiner, Frickenhausen
Zellharvester Filterplatte	Wallace, Freiburg

3.1.4 Primer für die IL-10 Genotypisierung

IL10-819anti	5' - AGGATGTGTTCCAGGCTCCT - 3'	Operon, Köln
IL10-819C	5' - CCCTTGTACAGGTGATGTAAC - 3'	Operon, Köln
IL10-819T	5' - ACCCTTGTACAGGTGATGTAAT - 3'	Operon, Köln
IL10-1082anti	5' - CAGTGCCAACTGAGAATTTGG - 3'	Operon, Köln
IL10-1082G	5' - CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG - 3'	Operon, Köln
IL10-1082A	5' - ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA - 3'	Operon, Köln
IDSP-sense	5' - TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC - 3'	Sigma-ark, Darmstadt
IDSP-anti	5' - TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA - 3'	Sigma-ark, Darmstadt
ID-sense	5' - CTGGAGACCACTCCCATCCTTTTCT - 3'	Sigma-ark, Darmstadt
ID-anti	5' - GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT - 3'	Sigma-ark, Darmstadt

3.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Binding-Puffer:

10mM Hepes/NaOH pH 7,4 (1,19g/500ml)

140mM NaCl (MW 58,44 – 4,091g/500ml)

2,5mM CaCl₂ (MW 147,02 – 183,78mg/500ml)

Um den Binding-Puffer herzustellen, wird zuerst 1,19g Hepes/NaOH abgewogen, in 400ml Aqua dest. gelöst und der pH von 7,4 eingestellt. Dann wird 4,091g NaCl und 183,78mg CaCl₂ dazugeben und gelöst. Die Lösung wird auf 500ml aufgefüllt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

1.8% Natriumchlorid-Lösung

9g NaCl/500ml Aqua dest.

Zur Herstellung der 1,8% Natriumchlorid-Lösung wird 9g NaCl in 500ml Aqua dest. gelöst und autoklaviert.

3.1.6 Materialien für die Durchflusszytometrie

<u>Antikörper</u>	<u>Klon</u>	<u>Firma</u>
CD14 PerCP	M-Phi-P9	Becton Dickinson, Heidelberg
CD16 PE	3G8	Invitrogen, Karlsruhe

CD14:

Zellen die das Antigen exprimieren: myelomonocytische Zellen

Molekülmasse: 53-55 kDa

Funktionen: Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid und lipopolysacchridbindendem Protein

CD16:

Zellen die das Antigen exprimieren: neutrophile Zellen, NK-Zellen, Makrophagen

Molekülmasse: 50-80 kDa

Funktionen: vermittelt Phagozytose und antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität

To-Pro-3-Iodid

Beim To-Pro-3-Iodid handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der nach Laseranregung bei 635nm (Diodenlaser) zum Emissionsmaximum bei 661nm Wellenlänge aktiviert wird. Dieses wird im Fluoreszenzkanal 4 des Durchflusszytometers FACSCalibur[®] registriert. To-Pro-3-Iodid dient zur Färbung der nekrotischen Zellen.

To-Pro-3-Iodid (Molecular Probes, Leiden, Holland)

- Stocklösung 1mM in DMSO = 1mmol; 1:1000 mit PBS verdünnt (=1µmol)
- Portioniert a 1ml; -20C°
- Gebrauchslösung 1µM in PBS
- Endkonzentration: 50nmolar

3.1.7 Zytokine (IL-10; TNF- α)

IL-10 (Strathman Biotech GmbH, Hamburg)

- Stocklösung 10 μ g/ml
- Portioniert a 50 μ l; -20C°
- Endkonzentration: 40ng/ml

TNF- α (Strathman Biotech GmbH, Hamburg)

- Stocklösung 10 μ g/ml
- Portioniert a 10 μ l; -20C°
- Endkonzentration: 40ng/ml

3.1.8 Materialien für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Phorbol-12-Myristat-13-Aceatat (PMA)

Phorbol-12-Myristat-13-Aceatat (PMA) greift ohne Beteiligung von Rezeptoren in die Enzymkaskade ein, die an der Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten beteiligt ist. Durch PMA wird die Proteinkinase C und damit indirekt auch die für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wichtige NADPH-Oxidase aktiviert.

PMA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

- Stocklösung 0,1 mg/ml in DMSO
- Portioniert a 10 μ l; -20C°
- Gebrauchslösung 2 μ g/ml in PBS
- Endkonzentration 100ng/ml

Dihydrorhodamin 123 (DHR)

Das nichtfluoreszierende Dihydrorhodamin 123 (DHR) wird von Zellen aufgenommen und durch Oxidation (katalysiert durch Myeloperoxidase) zum grünfluoreszierenden Metaboliten Rhodamin 123 umgewandelt. Dieser Farbstoff ist durchflusszytometrisch bestimmbar und stellt ein Mass für die ROS-Bildung einer Zelle dar. Rhodamin 123 emittiert nach der Anregung durch den Argonlaser (488 nm) Licht im grünen Bereich von 534nm.

DHR (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

- Stocklösung 5mmolar in DMSO
- Portioniert a 10µl; -20C°
- Gebrauchslösung 100µM in PBS (aufgrund einer geringen Stabilität nur innerhalb eines Tages verwendet)
- Endkonzentration: 2µM

Hydroethidin (HE)

Hydroethidin entsteht bei der Reduktion von Ethidiumbromid und ist eine fluoreszierende Racemat-Verbindung. Es wird leicht von lebenden Zellen aufgenommen und zeigt eine blaue Fluoreszenz im Zytoplasma, wenn es mit UV-Licht (370nm) angeregt wird. Innerhalb der lebenden Zellen wird HE enzymatisch dehydriert und es bilden sich Ethidiumionen. Ethidium wird aufgrund seines kationischen Charakters in die Zelle eingeschlossen und in die DNA eingebaut. Es zeigt eine blaue Fluoreszenz, wenn es entweder durch sichtbares Licht (535nm) oder UV-Licht (370nm) angeregt wird.

HE (Polyscience GmbH, Eppelheim)

- Stocklösung 50mM in DMF
- Portioniert a 10µl; -70C°
- Gebrauchslösung 1mM in PBS steril filtriert
- Endkonzentration: 50µmolar

3.1.9 Materialien für die Bestimmung der T-Zellproliferation

Tritium-Thymidin (^3H -Thymidin) und Phytohämagglutinin (PHA)

Zur Analyse der spezifischen Immunfunktion wurde die T-Zellproliferation mittels ^3H -Thymidin-Einbau bestimmt. Als polyklonales Antigen wurde Phytohämagglutinin (PHA) verwendet. Polyklonale Mitogene scheinen im Prinzip dieselben Mechanismen einer Wachstumsreaktion zu aktivieren wie ein Antigen. Lymphozyten ruhen normalerweise in der G_0 -Phase des Zellzyklus. Nach Stimulation mit einem polyklonalen Mitogen treten sie in die G_1 -Phase ein und durchlaufen dann den gesamten Zellzyklus. Um die Lymphozytenproliferation zu messen, wird als Zeichen der DNA-Synthese der Einbau von ^3H -Thymidin in die zelluläre DNA gemessen.

PHA (Biochrom, Berlin)

- Stocklösung 250 $\mu\text{g/ml}$
- Portioniert a 1ml; -20°C
- Gebrauchslösung 1,25 $\mu\text{g/ml}$ in RPMI
- Endkonzentration: 62,5ng/ml

 ^3H -Thymidin (Amersham, Braunschweig)

- Stocklösung 120 μCi
- Portioniert a 10ml; -20°C
- Gebrauchslösung 1,5 μCi
- Endkonzentration: 0,25 $\mu\text{Ci}/100\mu\text{l}$

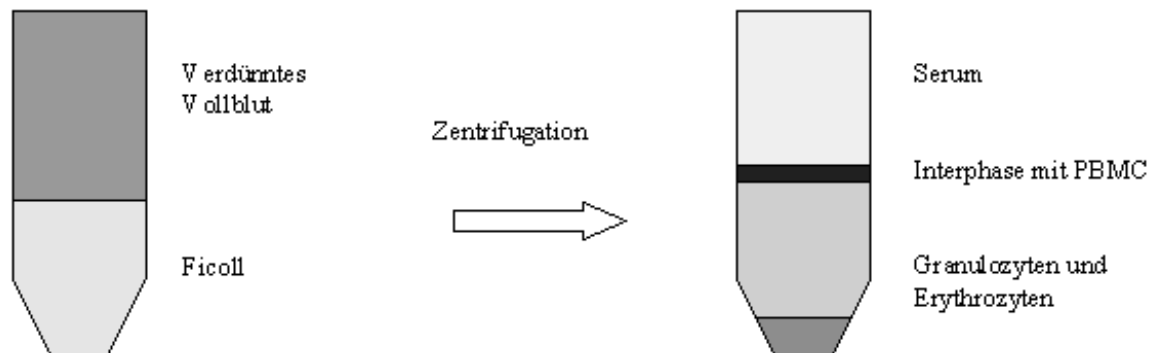
3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung der Leukozyten aus dem peripheren Blut

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden aus Vollblut (VB) über eine Ficoll Dichte-Gradient-Zentrifugation gewonnen werden. Da Ficoll etwa die gleiche Dichte hat wie Lymphozyten, Monozyten und auch Thrombozyten, werden diese durch die

Zentrifugation in der Interphase angereichert und erscheinen dort als weisser Ring. Erythrozyten, Granulozyten und Zelltrümmer haben eine grössere Dichte, passieren die Ficoll Schicht und werden pelletiert (Abb. 1).

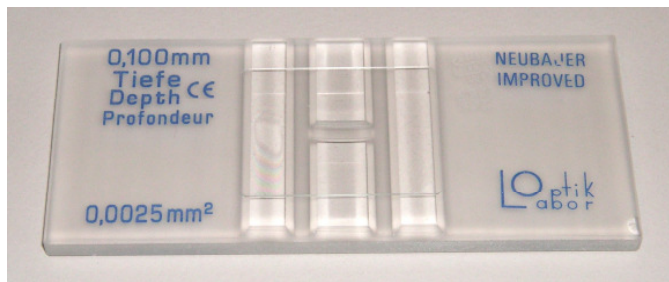
Je 2,5ml Li-Hep-Blut wurde mit 6,5ml PBS+0,02% EDTA versetzt und kurz gevortext. Dies wurde dann über 3,5ml Ficoll vorsichtig geschichtet und 20 min bei 2500 rpm bei 4°C ohne Bremse zentrifugiert. Nun wurde die Interphase mit den PBMC's abgenommen und in 15ml Falcon-Röhrchen zweimal mit PBS+0,02% EDTA gewaschen. Das Pellet wurde dann in 2ml RPMI-Kulturmedium (RPMI 1640 + 10%FCS + 1%Glutamin + 1%Pen Strep) aufgenommen, die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (s.3.2.2) und auf 40 000/100µl eingestellt.



1. Abb.: Ficoll Dichte-Gradient-Zentrifugation

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Neubauer-Zählkammer ist eine ca. 3cm x 8cm grosse und ca. 5mm dicke Glasplatte mit eingezähten, quadratischen Feldern definierter Grösse, die zur Zählung aller Arten von Zellen (Erythrozyten, Leukozyten) in der Medizin und Biologie verwendet wird (Abb. 2).

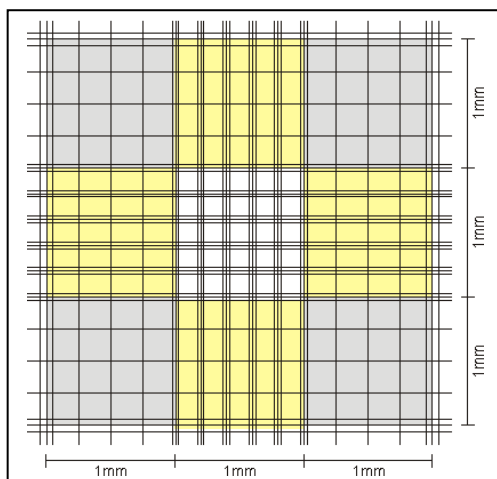


2. Abb.: Neubauer-Zählkammer

Zur Zählung der Leukozyten werden 4 grosse Eckquadrate ausgezählt und man teilt diese Anzahl durch 4 um einen Mittelwert pro Eckquadrat zu erhalten (Abb. 3).

Berechnung: Zellen/ml = Mittelwert (Zellen) x Kammerfaktor (10) x Verdünnung

Zellen insgesamt = Zellen/ml x vorgelegtes Volumen



3. Abb.: Neubauer-Zählkammer (schematische Darstellung)

3.2.3 Bestimmung der klinischen Laborparameter

Die Bestimmung der in der Arbeit verwendeten Laborparameter erfolgte im klinisch chemischen Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes.

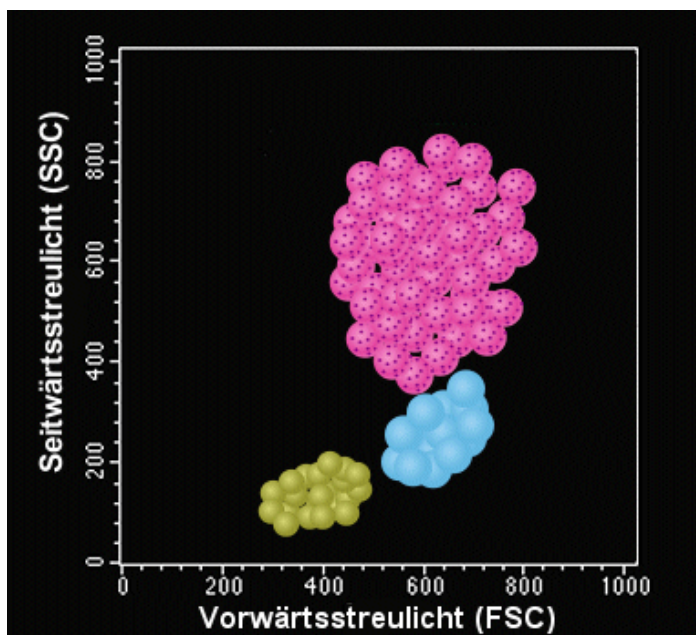
3.2.4 Durchflusszytometrie – FACS-Analyse

Mittels Durchflusszytometrie (FACS) werden verschiedene optische Eigenschaften von Zellen mit hoher Durchsatzrate quantifiziert. In Suspension befindliche Zellen fließen,

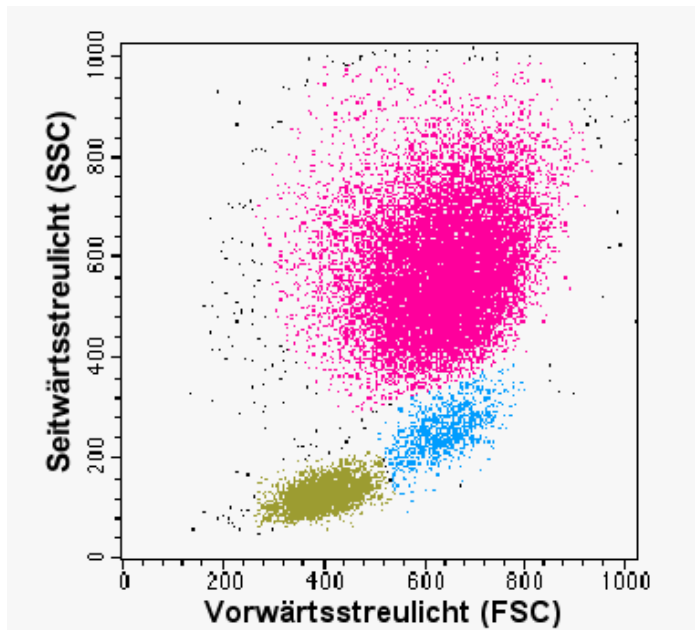
durch eine besondere Führung in einer Trägerflüssigkeit (Sheat fluid) vereinzelt, hintereinander (im „Gänsemarsch“) durch eine dünne Messkammer. Die zu untersuchenden Zellen werden beim Durchfliessen von der Seite von einem Laserlicht angestrahlt. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht mit der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts. So erhält man wichtig Informationen über die Zelle. Gemessen wird das Streulicht an zwei Stellen

- in Richtung des ursprünglichen Strahls → Vorwärtsstreulicht = Forward-Scatter = FSC (spiegelt die Grösse der Zelle wieder)
- etwa im rechten Winkel zum ursprünglichen Strahl → Seitwärtsstreulicht = Side-Scatter = SSC (abhängig von Oberflächenbeschaffenheit und Granularität)

Die Darstellung der Zellen erfolgt in einem sog. „Dot-Plot“, „Density-Plot“ oder „Histogramm“. Werden FCS und SSC in einem „Dot-Plot“ gegeneinander aufgetragen, so stellen sich morphologisch ähnliche Zellen als zusammenhängende Wolke dar (Abb. 4+5).



4. **Abb.: Schematische Darstellung eines Dot-Plot;** Grün: Lymphozyten (klein, kaum Granula); Blau: Monozyten (gross, kaum Granula); Pink: Neutrophile Granulozyten (gross, viele Granula); (eosinophile Granulozyten lassen sich rein morphologisch nicht von neutrophilen Granulozyten unterscheiden)



5. Abb.: Reale Darstellung eines Dot-Plot; jeder Punkt entspricht einer gemessenen Zelle und die Farben kann man den einzelnen Zellen bei der Auswertung zuordnen

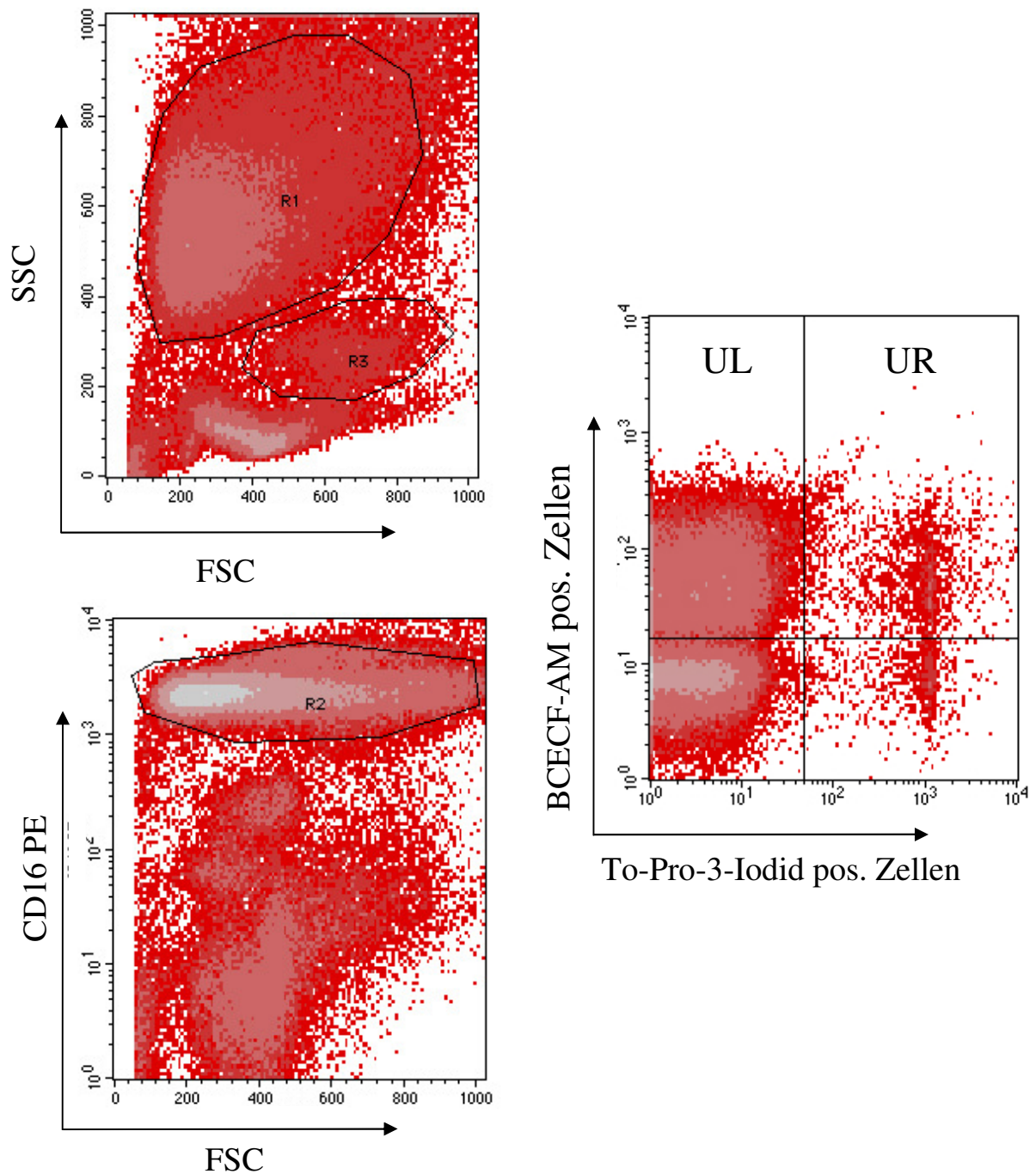
Da man mit dem Durchflusszytometer auch Fluoreszenzlicht messen kann, können viele Merkmale auf den Blutzellen untersucht werden. Um die Ausprägung verschiedener Antigene zu erforschen, färbt man die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Der Antikörper setzt sich auf die Zellen, die sein Zielantigen exprimieren und markiert diese. Beim Durchqueren des Laserstrahls des Durchflusszytometers leuchtet diese dann auf. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessung werden ebenfalls in einem Dot-Plot oder Density-Plot dargestellt.

Das optische System des Durchflusszytometers FACSCalibur[®] entspricht einem Dual-Lasersystem, d.h. es verfügt über zwei Laser. Der Argonlaser erzeugt Licht der Wellenlänge 488nm, der ihm zeitlich nachgeschaltete Diodenlaser Licht der Wellenlänge 635nm. Dem Argonlaser sind zusätzlich zu den Streulichtdetektoren drei Fluoreszenzdetektoren zugeordnet. Der Detektor „FL1“ nimmt Licht im Wellenlängenbereich von 500-560nm (Grünfluoreszenz) auf, der Detektor „FL2“ arbeitet bei 543-627nm (Orangefluoreszenz) und „FL3“ registriert Licht im Bereich von ≥ 650 nm (Rotfluoreszenz). Dem Diodenlaser ist der Detektor „FL4“ zugeordnet, der Ereignisse

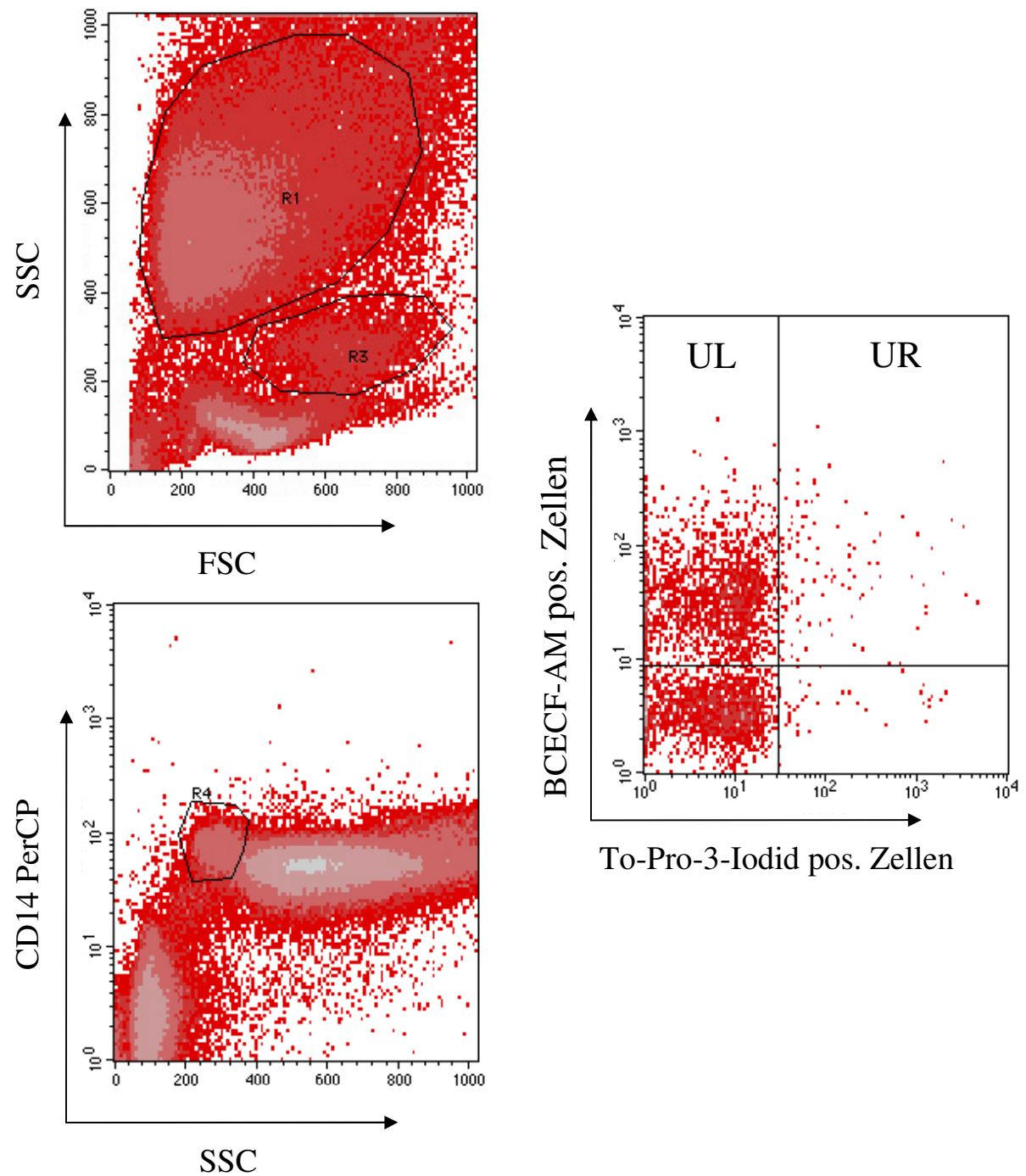
erfasst, die Licht im Bereich von 645-676nm (Rotfluoreszenz) emittieren und die in definiertem zeitlichen Abstand nach der Passage des Argonlasers auftreten. So können bis zu 6 Parameter (FSC, SSC, FL1- FL4) erfasst werden und mit Hilfe der entsprechenden Software (CELLQuest ProSoftware von Becton Dickinson) untereinander korreliert und ausgewertet werden.

3.2.5 Gating Strategie

Zur Bestimmung der prozentualen Phagozytoseleistung wurde der Anteil der BCECF-AM gelabelten Bakterien im Phagozytose-Assay durchflusszytometrisch bestimmt und der Anteil BCECF-AM positiver Granulozyten bzw. Monozyten als Mass für die Phagozytoseleistung genommen. Die Auswertung der FACS Daten erfolgten mit CELLQuest ProSoftware (Becton-Dickinson, Heidelberg). Zur Auswertung wählten wir die "DotPlot" Darstellung. Hier wird jede Zelle in einem Koordinatensystem dargestellt, wobei den Achsen die Parameter Grösse, Granularität und spezifische Expressionsdichte einzelner angefärbter Antigene zugeordnet werden. Man kann nun durch das Markieren von Regionen im "DotPlot" und deren Kombination einzelne Populationen herausfiltern und analysieren (Abb. 6+7).



6. Abb.: Gating Strategie für die Granulozyten in der DotPlot-Darstellung: Die Granulozyten wurden anhand der Lage im FSC/SSC (R1) und der Expression des Fc- γ Rezeptors CD16 PE (R2) definiert. Die Frequenz vitaler Granulozyten, die BCECF-AM gelabelte Staph. aureus aufgenommen haben, sind in der DotPlot Darstellung BCECF-AM pos. Zellen vs. To-Pro-3-Iodid pos. Zellen bestimmt worden (UL = vitale Granulozyten, UR = nekrotische Granulozyten).



7. Abb.: Gating Strategie für die Monozyten in der DotPlot-Darstellung: Die Monozyten wurden anhand der Lage im FSC/SSC (R3) und der Expression des LPS-Rezeptors CD14 PerCP (R4) definiert. Die Frequenz vitaler Monozyten, die BCECF-AM gelabelte Staph. aureus aufgenommen haben, sind in der DotPlot Darstellung BCECF-AM pos. Zellen vs. To-Pro-3-Iodid pos. Zellen bestimmt worden (UL = vitale Monozyten, UR = nekrotische Monozyten).

3.2.6 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die Datenanalyse erfolgte mit GraphPad Prism 4.0 (San Diego, CA, USA).

In den Abbildungen sind in den Balkendiagrammen der Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Bei der Darstellung mittels Box plots sind der Median und die 25./75. Perzentile dargestellt.

Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Analyse auf Normalverteilung getestet. Soweit dies zutraf, wurde mit gepaarten bzw. ungepaarten t-Tests zwischen zwei Kollektiven verglichen. Beim Vergleich von drei Gruppen verwendeten wir den one-way-Anova Test mit Bonferronis Test als post test. Bei einem p-Wert<0,05 wurden die Unterschiede als signifikant bewertet. Korrelationsanalysen normalverteilter Proben wurden gemäss Pearson analysiert.

3.3 Studienablauf

3.3.1 Blutentnahme und Gewinnung von Plasma/Serum

Blut wurde aus der Vena intermedia antebacchii in ein Li-heparinisiertes Röhrchen überführt. Plasma bzw. Serum wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 3000rpm, 4°C gewonnen. Portioniertes Plasma bzw. Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -86°C tiefgefroren.

Die Abnahme des Blutes der Hämodialyse - Patienten erfolgte vor Beginn der Dialyse aus dem Shunt oder Sheldon-Katheter.

3.3.2 Labelling von *Staph. aureus* mit BCECF-AM

Die Herstellung der BCEFF-AM gelabelten Bakterien erfolgte in der mikrobiologischen Abteilung der Universitätsklinik des Saarlandes nach einer Methode von Martin et al (1992).

Eine *Staph. aureus* Kultur (*Staph. aureus* Wood 46) wurde 6h kultiviert und anschliessend wurden 1,5ml der Bakterienkultur zentrifugiert und pelletiert. Die pelletierten Zellen

wurden in 1,0ml PBS aufgenommen. Das Labeling der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 30µl einer 20µmolaren BCECF-AM Lösung. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 30min bei leichtem Schütteln. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Bakterien in Formalin fixiert. BCECF-AM gelabelte Bakterien wurden lichtgeschützt bei +4°C aufbewahrt. Die Bakterienzahl wurde durch mikroskopische Zählung bestimmt und auf 2,5 Mrd/ml eingestellt.

3.3.3 Phagozytose-Assay

Heparinisiertes Blut wurde direkt nach der Abnahme in einem Eisbad gekühlt. Das Vollblut wurde a 100µl in eine 96well Rundbodenplatte pipettiert. Nach einer zehnminütigen Inkubation im Eisbad wurde der Phagozytose-Assay durch Zugabe einer Bakteriensuspension (je 6,25 Mio. BCECF-AM-gelabelte *S. aureus*/well) und einer zwanzigminütigen Inkubation im Schüttelwärmeschränk (37°C) gestartet. Der Stop der Phagozytoseaktivität erfolgte durch eine zehnminütige Inkubation im Eisbad. Die Proben wurden anschliessend in gekühlte FACS-Röhrchen (Polystyren geeignet zur FACS-Analyse am FACS-Calibur) umpipettiert.

Zur Erythrozytenlyse wurde je Röhrchen 2ml Aqua dest. hinzugefügt und der Vorgang nach 40sek durch Zugabe von 2ml 1,8% NaCl-Lösung abgestoppt. Bei unvollständiger Lyse wurde dieser Vorgang noch einmal wiederholt.

Um Monozyten und Granulozyten bei der FACS-Messung besser zu differenzieren, wurden die Zellen in je 44µl Binding-Puffer aufgenommen und mit jeweils 5µl CD14 PerCP und 1µl CD16 PE gefärbt und einmal mit 2ml Binding-Puffer gewaschen.

Das Pellet wurde in 200µl Binding-Puffer resuspendiert. Anschliessend wurden die eisgekühlten Proben mit 5µl To-Pro-3-Iodid (=50nmol/ml) versetzt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert. Die Granulozyten wurden anhand der Lage im FSC/SSC und der Expression des Fc-γ-Rezeptors CD16, die Monozyten anhand der Lage im FSC/SSC und der Expression des LPS-Rezeptors CD14 definiert.

Bakterien-Stock (*Staph. aureus*)

Bakterien werden in Mikrobiologie hochgezogen und mit BCECF-AM gelabelt (s.3.3.2)
Stock 2,5 Mrd/ml = 2,5 Mio/µl; d.h. 2,5µl vom Stock /well = 6,25 Mio.

3.3.4 Temperaturabhängigkeit der Phagozytoseleistung im Vollblutassay

Heparinisiertes Blut wurde direkt nach der Abnahme in einem Eisbad gekühlt. Das Vollblut wurde a 100µl in eine 96well Rundbodenplatte pipettiert. Der folgende Phagozytose-Assay wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt, mit der Zugabe einer Bakteriensuspension von je 6,25 Mio. BCECF-AM-gelabelte *Staph. aureus*/well.

Die Durchführung der bei Raumtemperatur (RT) behandelten bzw. der auf Eis gekühlten Proben unterschieden sich in folgenden Punkten: Bei den 4°C-Proben erfolgten die Zentrifugationsschritte in einer 4°C gekühlten Zentrifuge und als das Vollblut in die wells der 96well Rundbodenplatte pipettiert wurden, stand die Platte bereits auf Eis. Ausserdem wurden für die einzelnen Arbeitsschritte vorgekühlte Lösungen verwendet.

3.3.5 Stimulation der Zellen mit IL-10 und TNF- α im Vollblut über 24h

Heparinisiertes Blut wurde nach der Abnahme bis zu Verwendung gekühlt aufbewahrt. In eine 6well ultra-low attachment Platte wurden pro Proband in drei wells je 1,5ml Vollblut und 1,5ml Medium mit RPMI + 1,5% FCS +1% Glutamin pipettiert. Ein well diente als Kontrolle, in das zweite well kamen 40ng/ml IL-10 dazu und in das dritte well 40ng/ml TNF- α . Nach kurzem mischen wurde die Platte für 24h im Brutschrank inkubiert.

Die Proben wurden dann pro well zu je vier Ansätzen mit 100µl in eine 96well Rundbodenplatte umpipettiert. Der folgende Phagozytose-Assay wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt mit einer Menge von 6,25 Mio. BCECF-AM-gelabelten *Staph.aureus* pro 100µl well.

Um den Einfluss einer 24h Inkubation zu untersuchen, führten wir den Test bei fünf Probanden durch. Es handelte sich um drei HD-Patienten und zwei gesunde Probanden.

3.3.6 Phagozytoseleistung mit verschiedenen BCECF-AM gelabelten *Staph. aureus* Konzentrationen

Um die optimale Konzentration der BCECF-AM gelabelten *Staph. aureus* für unsere Versuche herauszufinden, führten wir bei zwei Probanden den Phagozytoseassay mit 100µl Vollblut nach 1h Inkubation im Brutschrank mit verschiedenen Konzentrationen der

Bakterien durch. Wir verwendeten jeweils 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 und 50 Mio. BCECF-AM gelabelte *Staph. aureus*.

3.3.7 Phagozytoseleistung mit verschiedenen IL-10 Konzentrationen

Um die optimale Konzentration von IL-10 für den Phagozytoseassay herauszufinden, bzw. um zu testen ob eine höhere Konzentration von IL-10 einen grösseren Effekt verursacht, führten wir bei drei Probanden den Phagozytoseassay mit zwei verschiedenen IL-10 Konzentrationen durch. Wir verwendeten 40ng/ml und einmal 400ng/ml. Als Vergleichswert diente uns eine zusätzliche Testreihe ohne Stimulation (basal).

3.4 Phagozytoseleistung und Stimulation mit IL-10 und TNF- α

Heparinisiertes Blut wurde direkt nach der Abnahme in einem Eisbad gekühlt. Das Vollblut wurde a 100 μ l in eine 96well Rundbodenplatte pipettiert. Pro Stimulationsansatz fügten wir IL-10 (= 40ng/ml) bzw. TNF- α (= 40ng/ml) hinzu. In die unstimulierten Proben pipettierten wir RPMI-Medium + 1% Glutamin ohne FCS (Abb. 8).

Nach kurzem Mischen der Platte auf dem Plattenschüttler wurde die 96well Rundbodenplatte für 1h im Brutschrank (37°C, 6% CO₂) inkubiert.

Der folgende Phagozytose-Assay wurde wie unter 3.3.2 beschrieben durchgeführt mit einer Menge von 6,25 Mio. BCECF-AM-gelabelten *Staph aureus* pro well.

Um den Einfluss von anti-inflammatorischen IL-10 bzw. pro-inflammatorischen TNF- α auf die Phagozytoseleistung zu untersuchen wurden Hämodialysepatienten sowie nierengesunden Kontrollpersonen (s. 3.1.8) untersucht.

3.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies bei HD vs. Kontrollen

Zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies wurden mittels durchflusszytometrischer Methoden Hydroethidin (HE) und Dihydrorhodamin 123 (DHR123) eingesetzt und die relative Anzahl und Frequenz der reaktiven Granulozyten bestimmt. Dabei wird ein nicht

fluoreszierendes Substrat in aktivierten Zellen unter Einfluss der dort gebildeten reaktiven Sauerstoffmetaboliten zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt (Dihydrorhodamin (DHR123) zu Rhodamin und Hydroethidin (HE) zu Ethidiumbromid). Die entstehende Fluoreszenz kann im Durchflusszytometer quantitativ gemessen werden. Hierzu wurden in eine 96well Rundbodenplatte pro Proband jeweils 100µl (Dreifachwerte) Vollblut pipettiert. Dann erfolgt eine 1h Inkubation im Brutschrank (37°C; 6%CO₂). Nachdem die Platte 10min auf Eis gestellt worden war, kamen in die entsprechenden Proben 5µM HE bzw. 2µM DHR123. Anschliessend wurden die Proben mit 10ng PMA stimuliert. Nach 30min bei 37°C im Schüttelschrank wurden die Proben erneut 10min auf Eis gestellt und in klare FACS-Röhrchen umpipettiert. Die anschliessende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen erfolgte wie unter 3.3.3 beschrieben. Zur Charakterisierung der Monozyten wurden die Proben mit anti CD14 PerCP gefärbt.

Parallel dazu führten wir bei jedem Probanden den Phagozytoseassay durch.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde im Vollblutassay bei Hämodialysepatienten sowie nierengesunden Kontrollpersonen (s. 3.18.) untersucht.

3.6 IL-10 Genotypisierung

3.6.1 Isolierung der DNA

Zur DNS Isolierung wurde das DNS Mini Kit von Quiamp verwendet. Dafür werden 200µl heparinisiertes Vollblut als erstes mit einer Proteinase K verdaut und im Folgenden auf eine Säule gegeben wo die DNS an eine Membran bindet. Nach zweimaligem Waschen und anschliessendem Auswaschen der DNS aus der Membran erhält man eine aufgereinigte Probe. Diese enthält zwischen 3-12µg DNS bis zu einer Länge von 50kb (v.a. 20-30kb). Die Proben wurden bei -20°C tiefgekühlt bis zu ihrer Verwendung gelagert.

3.6.2 Genotypisierung des Interleukin-10 mittels PCR

Zur Analyse des IL-10 Polymorphismus wurde eine ARMS-PCR (“amplification refractory mutation system”) verwendet, die entwickelt wurde um Punktmutationen nachweisen zu können. Perrey et al. beschrieben diese Methode für den Nachweis des IL-10 SNP (“single nucleotid polymorphism”) in der Promotorregion Position –1082 (G/A), Position –819 (C/T) und –592 (C/A) (Perrey, 1999). Dazu werden Primer verwendet, deren Sequenz den zu untersuchenden Varianten entspricht. Hierbei ist wichtig, dass die Primer am 3’Ende mit der Base enden, um die sich die beiden Sequenzen unterscheiden.

PRIMER-SEQUENZ:

IL10 –819 anti-sense	5' – AGGATGTGTTCCAGGCTCCT - 3'
IL10 –819 C sense	5' – CCCTTGTACAGGTGATGTAAC - 3'
IL10 –819 T sense	5' – ACCCTTGTACAGGTGATGTAAT - 3'
IL10 –1082 anti-sense	5' – CAGTGCCAACTGAGAATTTGG - 3'
IL10 –1082 G sense	5' – CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG - 3'
IL10 –1082 A sense	5' – ACTACTAAGGCTTCTTTGGGAA - 3'

Bei der verwendeten PCR handelt es sich um eine 2-Schritt PCR, d.h. Annealing und Extention erfolgten bei gleicher Temperatur.

THERMOCYCLER PROGRAMM:

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit	
1	95°C	15min	HotStarTaq Aktivierung
30	95°C	1min	Denaturierung
	64°C	1min45sec	Annealing + Extention

Durch Bestimmung der SNP's an den Positionen –1082 und –819 ist auch der SNP an Position –592 (C/A) festgelegt. Daraus ergeben sich eine Reihe möglicher Genotypen, von denen jedoch nur sechs verschiedene beim Menschen beschrieben wurden. Mittels in vitro Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die verschiedenen Genotypen mit unterschiedlich hohen IL-10 Produktionen (hoch, mittel, niedrig) assoziiert sind.

Genotyp	IL-10 Produktion
GCC-GCC	Hoch
GCC-ACC	Mittel
GCC-ATA	Mittel
ACC-ACC	Niedrig
ACC-ATA	Niedrig
ATA-ATA	Niedrig

Testdurchführung:

Reagenz	Stammkonzentration	Menge je Ansatz
1) Aqua dest.	N/A	7,85
2) Qiagen-Puffer	10x	2,5
3) dNTP (Roche)	10mM	0,5
4) MgCl ₂	25mM	2,0
5) SolutionQ	5x	5,0
6) BSA	2,5mM	2,5
7) Primer sense (G/A/C/T)	20µM	1,25
8) Primer antisense (-1082/-819)	20µM	1,25
9) HotStarTaq	5U/µl	0,15
DNS		2,0
Reaktionsvolumen		25

Die Reagenzien wurden in oben aufgeführter Reihenfolge in eisgekühlte Eppendorfgefässe als Mastermix zusammen pipettiert. Für die vier möglichen SNPs G/A/C/T wurde je ein Mastermix hergestellt. Es wurde in 4 verschiedene eisgekühlte Eppendorfreaktionsgefässe je 2µl der zu analysierenden DNS vorgelegt und je 23µl des entsprechenden Mastermixes hinzupipettiert. Anschliessend wurden die Proben in die PCR Maschine gestellt. Alle Arbeiten erfolgten ausschliesslich mit Filterpipettenspitzen. Nach den einzelnen Pipettierschritten wurde jeweils gevortext und kurz zentrifugiert.

3.6.3 Gel-Elektrophorese

Die aus der PCR erhaltenen DNS Fragmente wurden mittels einer Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1,5%-iges Agarosegel mit einer Dicke von etwa 0,5cm verwendet. Die DNS Fragmente wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und die sichtbaren Banden unter UV Licht fotografiert.

Reagenzien:

TAE Puffer stock 50x:	242g Trisbase + 57,1ml Eisessig + 100ml 0,5M EDTA (pH = 8) auffüllen ad 1l mit Aqua dest.
TAE Puffer 1x:	50ml TAE stock 50x auffüllen ad 2,5l mit Aqua dest.
DNS Loading Buffer:	0,25% Bromphenolblau + 0,25% Xylen Cyanol + 15% Ficoll (Typ 400) in Aqua dest. lösen

Testdurchführung:

Zur Herstellung eines 1,5% Agarosegels wurde die entsprechende Agarosemenge, in Abhängigkeit von der verwendeten Kammer, durch mehrmaliges Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen auf etwa 45°C wurde das noch flüssige Gel in die Kammer gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die ganze Kammer mit TAE Puffer 1x aufgefüllt.

Es wurden 10µl PCR Produkt mit 2µl Loading Puffer gemischt und davon je 8µl in die Taschen des Gels pipettiert. Die anschliessende Elektrophorese erfolgte bei 200mA und 130V für 20-30min in Abhängigkeit der Gelgrösse.

Nach Ende der Elektrophorese wurden die Gele in einer Lösung aus EtBr und Wasser für 10min gefärbt und anschliessend das überschüssiges EtBr in einem Wasserbad für 5min entfernt.

Die Banden wurden unter UV-Licht (312nm) sichtbar gemacht und fotografiert. Die digitale Auswertung und Speicherung erfolgte mit Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 von Kodak.

3.7 Proliferationsassay

3.7.1 Einsäen der PBMC in 96-U-well-Platte und Pulsen der Zellen mit ^3H -Thymidin

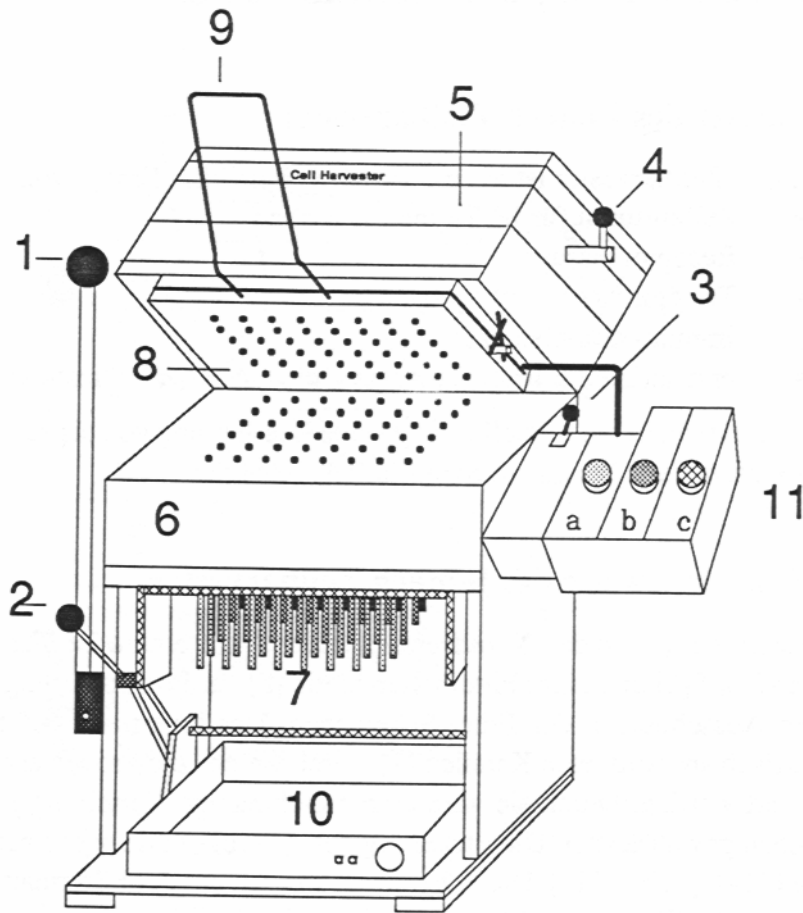
Nach Isolierung der PBMC's (s. 3.2.1) wurden in acht wells einer 96well Rundbodenplatte 40 000 PBMC/100 μl pro Proband eingesät. In vier der wells wurde als T-Zell-spezifischer Proliferationsstimulus Phytohämagglutinin (PHA) in einer Konzentration von 62,5ng/ml pipettiert. Nach 72h Inkubation im Brutschrank (37°C; 6% CO_2) wurden je 20 μl ^3H -Thymidin (0,25 μCi /well) hinzugefügt und die Platte für weitere 20h inkubiert.

Alle Platten wurden bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der ^3H -Thymidinaufnahme wurden sie in einem Zellharvester verarbeitet und die Thymidinaufnahme anschliessend im MikroBeta Counter bestimmt.

3.7.2 Erntevorgang im Zellharvester zur Analyse im MikroBeta Counter

Nachdem das Harvester-System (Abb. 8) zum Ernten vorbereitet war, wurde mit Hilfe der Vakuum-Pumpe ein Vakuum hergestellt. Eine 96-Loch Mikrotiterplatte wurde dann auf dem Platten-Lift-Tablett unter dem 96-Loch Pipetier-Kopf ausgerichtet. Die Mikrotiterplatte wurde so angehoben, dass die Kanülen in die Löcher passten und die 96-Loch-Platte vorsichtig gegen die Nylonspitzen gedrückt. Durch drücken des roten Ventils (Abb. 9: 11a) wurde die Lösung aus der Mikrotiterplatte angesaugt und das Probenmaterial haftete auf der Filterplatte. Die Filterplatte wurde anschliessend getrocknet, ein Szintillatorwachs (Meltilex) aufgeschmolzen und bis zur Messung im MikroBeta Counter aufbewahrt.

Um die T-Zell-Proliferation zu untersuchen wurden Hämodialysepatienten sowie nierengesunden Kontrollpersonen (s. 3.1.1) untersucht.



- 1 Hebelarm zum Verschließen des Harvester-Kopfes
- 2 Hebelarm zum Bewegen des Plattenlifts
- 3 Hebel zum Ver- und Entriegeln des Pipettierkopfes
- 4 Hebel zum Lösen der Filterhalterplatte
- 5 Harvester-Kopf
- 6 Pipettierkopf
- 7 Doppelkanülen zum Absaugen der Proben bzw. zum Dispensieren von Waschflüssigkeit
- 8 Filterhalterplatte
- 9 Griff der Filterhalterplatte
- 10 Platten-Lift-Tablett
- 11 Ventile zum Absaugen und Spülen
- 11a Rotes Ventil zum Ansaugen der Probenmaterialien, Abfluß zur Flasche für radioaktiven Abfall
- 11b Blaues Ventil zum Waschen
- 11c Grünes Ventil zum Absaugen der Waschflüssigkeit, Abfluß zur Flasche für nicht-radioaktiven Abfall

8. Abb.: Zellharvester (Quelle Berthold, Betriebsanleitung)

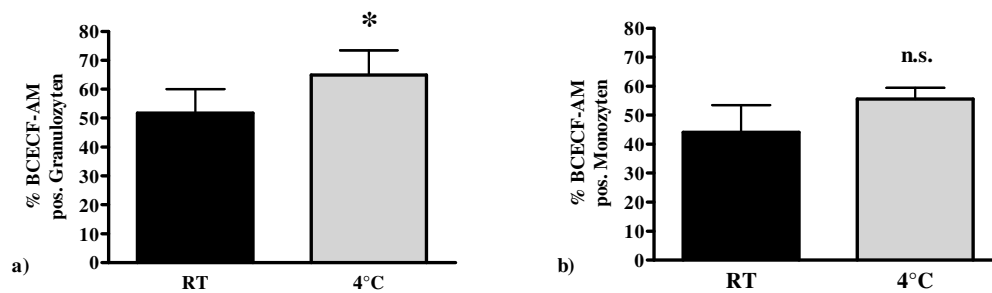
4 ERGEBNISSE

Um einen möglichst optimalen Versuchsaufbau zu gewährleisten, führten wir verschiedene Vorversuche durch, die im Folgenden näher erläutert werden.

4.1 Vorversuche

4.1.1 Einfluss der Temperatur auf die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten im Vollblut-Assay

Um festzustellen, welchen Einfluss die Temperatur auf den Phagozytoseassay hat, führten wir diesen an drei aufeinander folgenden Tagen bei einem gesundem Probanden jeweils einmal bei Raumtemperatur durch und einmal wurden alle Schritte des Versuchs bei 4°C durchgeführt. Der prozentuale Anteil BCECF positiver Granulozyten bei den Proben, die bei 4°C verarbeitet wurden, war mit $64,9 \pm 8,6\%$ im Vergleich zu den bei Raumtemperatur (RT) behandelten Proben mit $51,8 \pm 8,3\%$ signifikant erhöht ($p = 0,04$) (s. Abb. 9a). Bei Monozyten hingegen war mit einem prozentualen Anteil BCECF positiver Monozyten von $55,7 \pm 3,8\%$ bei 4°C lediglich eine Tendenz zu einem erhöhten Anteil im Vergleich zu $44,1 \pm 9,5\%$ bei den Proben die bei RT behandelt wurden zu erkennen ($p = 0,09$) (s. Abb. 9b). Um einen höheren Anteil BCECF positiver Zellen zu erreichen, führten wir auf Grund dieser Ergebnisse die folgenden Versuche bei 4°C durch.



9. Abb.: % Anteil BCECF positiver Granulozyten (a) und Monozyten (b) bei Raumtemperatur (RT) vs. 4°. Um festzustellen, welche Bedingungen für die Versuchsdurchführung am besten geeignet waren, führten wir alle Schritte des Phagozytoseassays einmal bei RT durch und einmal wurden alle Schritte des Versuchs bei 4°C durchgeführt. Der Anteil BCECF positiver Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es zeigte sich bei den Granulozyten ein signifikant erhöhter Anteil BCECF positiver Zellen (a) und bei den Monozyten (b) ein Trend zu einem erhöhten Anteil bei 4°C. Dargestellt sind $MW \pm SD$. $*$ = $p < 0,05$ RT vs. 4°C und $n.s.$ = $p > 0,05$ RT vs. 4°C (gepaarter t-Test).

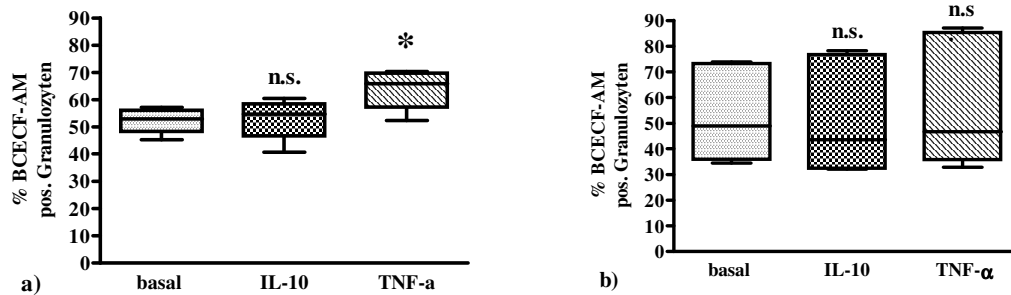
4.1.2 Stimulation der Zellen mit IL-10 und TNF- α im Vollblut über 1h und 24h

Ein kurzes (1h Inkubation) und ein langes (24h Inkubation) Zeitintervall wurde gewählt, um den Einfluss von anti-inflammatorischen IL-10 und pro-inflammatorischem TNF- α in Abhängigkeit von der Zeit im in vitro Phagozytose-Assay zu untersuchen.

Eine 1h Inkubation mit TNF- α vor Zugabe der Bakterien führte zu einem signifikant erhöhten Anteil BCECF positiver Granulozyten (TNF- α $63,9 \pm 7,2\%$ vs. basal $52,3 \pm 4,5\%$; $p < 0,05$). Durch die Stimulation mit IL-10 konnte kein Effekt gegenüber den unstimulierten Proben gezeigt werden (IL-10 $52,9 \pm 7,4$ vs. basal $52,3 \pm 4,5$; $n.s.$) (s. Abb. 10a).

Bei der 24h Stimulationsphase zeigten die Werte eine grössere Streubreite und der stimulierende TNF- α -Effekt war nicht mehr nachzuweisen (s. Abb. 10b). Bei den Monozyten führte die lange Inkubationszeit zu einer so starken Plastikadhärenz, so dass diese nicht überführt werden konnten und somit nicht auswertbar waren.

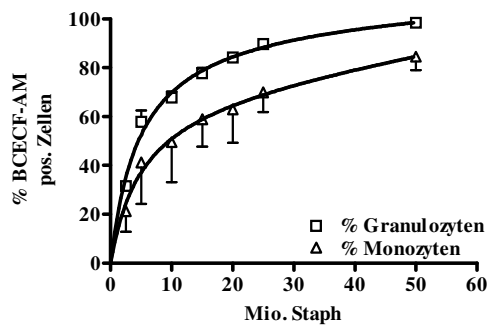
Auf der Grundlage dieses Ergebnisses inkubierten wir in den folgenden Versuchen die Zellen 1h mit den Zytokinen, da sich die Werte insgesamt homogener zeigten und der stimulierende Effekt durch TNF- α besser zu erkennen war.



10. Abb.: % Anteil der BCECF positiven Granulozyten nach 1h Inkubation (a) und nach 24h (b) (n = 5). 100µl Vollblut wurden mit IL-10, TNF-α und ohne Stimulus (basal) über 1h bzw. 24h inkubiert und anschliessend der Phagozytoseassay wie unter 3.3.4 beschrieben durchgeführt. Die Werte zeigten sich nach einer 24h Inkubation gegenüber einer 1h Inkubation deutlich inhomogener und der stimulierende Effekt von TNF-α konnte kaum gezeigt werden. Dargestellt sind Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile. n.s. = $p > 0,05$ verglichen mit basal-Werten; * = $p < 0,05$ verglichen mit basal-Werten (one way Anova mit Bonferroni als post test)

4.1.3 Austesten der optimalen Konzentration an BCECF-AM gelabelten Staph. aureus im Phagozytoseassay

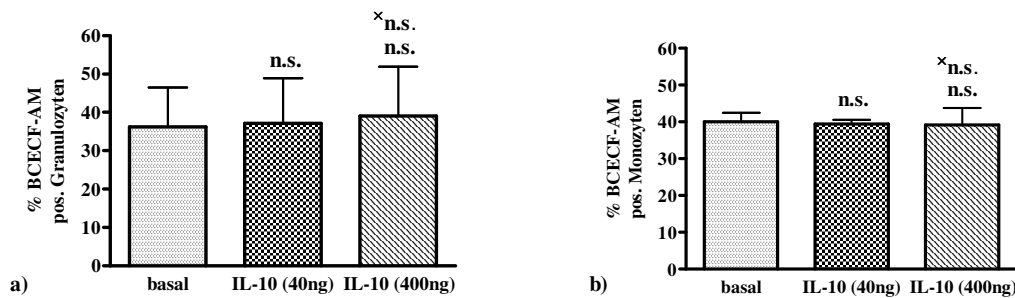
Um die optimale Konzentration der BCECF-AM gelabelten Staph. aureus für den Phagozytoseassay herauszufinden, führten wir diesen mit folgenden Konzentrationen der Bakterien durch: 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 und 50 Mio. jeweils pro 100µl Vollblut. Es zeigt sich, dass der Anteil BCECF positiver Zellen eine starke Korrelation zur verwendeten Bakterienkonzentration sowohl bei den Granulozyten als auch bei den Monozyten aufwies (s. Abb. 11). Für die folgenden Versuche wählten wir eine Bakterienkonzentration, die im exponentiellen Anstieg lag und verwendeten aus Praktikabilitätsgründen 6,25 Mio. BCECF-AM gelabelte Staph. aureus pro 100µl Vollblut.



11. Abb.: Verschiedene Konzentrationen BCECF-AM gelabelter Staph. aureus im Verhältnis zum % Anteil BCECF positiver Granulozyten und Monozyten (n = 2). Für den Phagozytoseassay wurden folgende Konzentrationen an Bakterien verwendet: 2,5, 5, 10, 15, 20, 25 und 50 Mio.. Es zeigte sich sowohl bei den Granulozyten als auch bei den Monozyten eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Bakterienkonzentration.

4.1.4 Austesten der optimalen IL-10 Konzentration im Phagozytoseassay

Um die optimale Konzentration von IL-10 für den Phagozytoseassay herauszufinden, bzw. um zu testen ob eine höhere Konzentration von IL-10 einen grösseren Effekt verursacht, führten wir den Phagozytoseassay jeweils mit einer Dosis von 40ng/ml und einmal mit 400ng/ml IL-10 durch. Als Vergleichswerte dienten uns die Werte ohne Zugabe von IL-10 (basal) mit einem Anteil BCECF positiver Zellen von $36,2 \pm 10,3\%$ bei den Granulozyten und $40,1 \pm 2,4\%$ bei den Monozyten. Es zeigte sich, dass eine zehnfach höhere Dosis von IL-10 mit einem prozentualen Anteil von $39,1 \pm 12,8\%$ keinen grösseren Effekt hatte als eine geringere Dosis mit einem Anteil von $37,1 \pm 11,8\%$ (n.s.). Auch bei den Monozyten zeigte sich, dass sowohl die zehnfache Dosis ($39,2 \pm 4,6\%$) als auch die niedrige Dosis ($39,5 \pm 1,0\%$) keinen Effekt im Vergleich zu den Werten ohne Stimulation hatte (n.s.) (s. Abb. 12). Aufgrund dieser Ergebnisse führten wir die folgenden Tests mit 40ng/ml IL-10 durch, da der Wirkungsbereich von IL-10 zwischen 1-50ng/ml liegt und wir uns somit im oberen Bereich bewegten.



12. Abb. Einfluss verschiedener IL-10 Konzentrationen auf den Anteil BCECF positiver Zellen (n=3). Für den Phagozytoseassay wurde IL-10 einmal in einer niedrigen Dosis (40ng) und einmal in einer zehnfach höheren Dosis (400ng) eingesetzt. Es konnte kein Effekt gezeigt werden, weder mit der zehnfachen Konzentration an IL-10 als mit der niedrigen Dosis. Dargestellt sind $MW \pm SD$. n.s. = $p > 0,05$ verglichen mit basal-Wert und * n.s. = $p > 0,05$ IL-10 (40ng) vs. IL-10 (400ng) (one way Anova mit Bonferroni als post test).

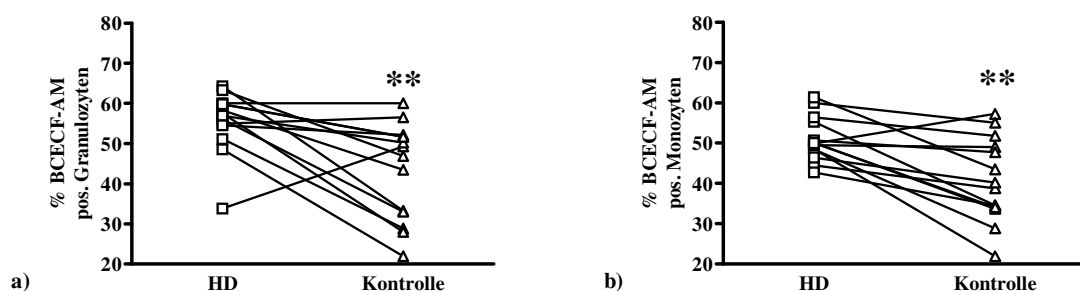
4.2 Messung der Phagozytoseleistung bei HD-Patienten im Vergleich zu einer gematchten nierengesunden Kontrollgruppe

Phagozytose spielt eine zentrale Rolle bei der Abwehr bakterieller Infektionen. Da bakterielle Infektionen für Hämodialysepatienten (HD-Patienten) nach wie vor ein grosses Risiko darstellen, untersuchten wir, ob bei ihnen eine verminderte Phagozytoseleistung vorliegt. Dabei wurden die BCECF-AM gelabelten Bakterien durchflusszytometrisch bestimmt und der Anteil BCECF-AM positiver Granulozyten bzw. Monozyten als Mass für die prozentuale Phagozytoseleistung genommen. HD-Patienten wurden jeweils mit einem nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen passenden nierengesunden Probanden aus der Augenklinik (Kontrolle) verglichen.

1. Tabelle: Probanden für die Bestimmung der Phagozytoseleistung. Es handelt sich hierbei um Hämodialysepatienten (HD) und nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen gematchte nierengesunde Patienten (Kontrolle) aus der Augenklinik.

	HD (n = 14)	Kontrolle (n = 14)
Alter (Jahren)	63,4±15,9	63,16±15,5
Geschlecht	6w/8m	6w/8m
Diabetes mellitus (ja/nein)	4/14	4/14
Kardiovaskuläres Ereignis (ja/nein)	5/14	5/14

Vergleicht man die Werte der BCECF-AM positiven Granulozyten bzw. Monozyten, als Mass für die Phagozytoseleistung, von 14 HD-Patienten mit denen von 14 gematchten Probanden der Kontrollgruppe, so zeigt sich eine signifikant gesteigerte prozentuale Phagozytoseleistung bei HD-Patienten, sowohl bei den Granulozyten mit 55,7±7,6% im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 43,4±12,0% ($p<0,01$) als auch bei den Monozyten mit einer Phagozytoseleistung von 51,5±5,5% bei HD-Patienten und 40,8±10,4% in der Kontrollgruppe ($p<0,01$) (s. Abb. 13).



13. Abb. Phagozytoseleistung bei HD-Patienten vs. gematchte Kontrollen (n=14).

100µl Vollblut wurden ohne Zytokinzusatz 1h inkubiert. Im Anschluss daran folgten der Phagozytoseassay mit der Lyse der Erythrozyten und der Färbung mit den Antikörpern CD14 PerCP und CD16 PE. Dargestellt ist die Phagozytoseleistung der BCECF-AM-pos. Granulozyten (a) sowie der BCECF-AM-pos. Monozyten (b). Die Phagozytoseleistung ist bei den HD-Patienten sowohl bei den Granulozyten als auch bei den Monozyten signifikant gesteigert gegenüber der gematchten Kontrollgruppe.

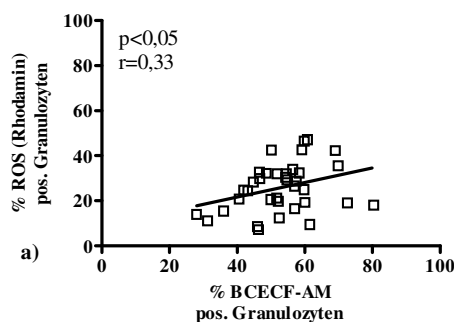
** = $p<0,01$ HD vs. Kontrolle (gepaarter t-Test).

4.3 ROS-Bildung in Bezug zur Phagozytoseleistung

Um festzustellen, welche Beziehung zwischen der ROS-Bildung und der Phagozytoseleistung besteht, haben wir die Spaltung von DHR123 in Rhodamin, und die Spaltung von Hydroethidin in Ethidiumbromid als Mass für die Bildung der ROS, mit der Phagozytoseleistung von Granulozyten bei 27 HD-Patienten und 9 nierengesunden Kontrollpersonen verglichen. Als Mass für die Phagozytoseleistung dienten uns der Anteil BCECF-AM positiver Granulozyten.

4.3.1 Assoziation zwischen ROS-Bildung und der Phagozytoseleistung mittels Bestimmung der ROS-Bildung durch Spaltung von DHR123

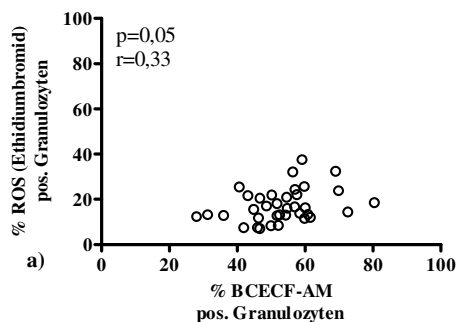
Es stellte sich heraus, dass bei der Spaltung von DHR123 in Rhodamin, mit steigender Phagozytoseleistung der Anteil an Rhodamin+ Granulozyten signifikant zunimmt ($p < 0,05$; $r = 0,33$) (s. Abb. 14).



14. Abb. : Zusammenhang DHR123-Spaltung, als Mass für die ROS-Bildung, zur Phagozytoseleistung (n = 36). Für den Test wurden jeweils 100µl Vollblut nach einer Inkubation von 1h mit 6,25 Mio. Staph. aureus und mit 2µM DHR123+10ng PMA stimuliert. Es folgten eine weitere Inkubation und daran anschliessende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen. Man erkennt, dass mit steigender Phagozytoseleistung der Granulozyten der Anteil an Rhodamin+ Granulozyten signifikant zunimmt (Korrelation nach Pearson).

4.3.2 Abhängigkeit der ROS-Bildung von der Phagozytoseleistung mittels Bestimmung der ROS-Bildung durch Spaltung von HE

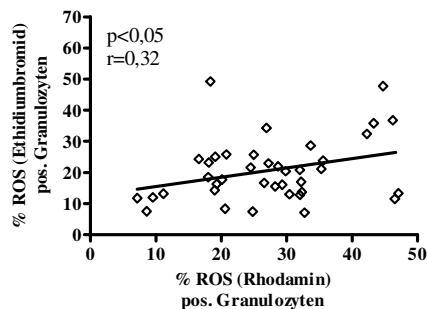
Es zeigte sich, dass mit steigender Phagozytoseleistung der Granulozyten ein Trend zur vermehrten Bildung Ethidiumbromid+ Granulozyten gesehen werden konnte ($p=0,05$; $r = 0,33$) (s. Abb.15).



15. Abb.: HE-Spaltung als Mass für die ROS-Bildung im Bezug zur Phagozytoseleistung (n = 36). Für den Test wurden jeweils 100µl Vollblut nach einer Inkubation von 1h mit 6,25 Mio. Staph. aureus und mit 5µM HE+10ng PMA stimuliert. Es folgten eine weitere Inkubation und daran anschliessende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen. Man erkennt einen Trend, dass mit steigender Phagozytoseleistung der Granulozyten der Anteil an Ethidiumbromid+ Granulozyten zunimmt (Korrelation nach Pearson).

4.3.3 Bildung von ROS: Vergleich der Messung durch DHR123-Spaltung mit der Messung durch HE-Spaltung

Vergleicht man die prozentuale ROS-Bildung durch Spaltung von DHR123 in Rhodamin mit der Spaltung von HE in Ethidiumbromid so erkennt man, dass beide Methoden signifikant miteinander korrelieren, diese Korrelation aber weniger eng ausfällt als erwartet ($p<0,05$; $r = 0,32$) (s. Abb. 16).



16. Abb.: Zusammenhang der DHR- und HE-Spaltung (n = 40). Für den Test wurden jeweils 100µl Vollblut nach einer Inkubation von 1h mit 5µM HE+10ng PMA bzw. mit 2µM DHR+10ng PMA stimuliert. Es folgten eine weitere Inkubation und daran anschließende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen. Man erkennt bei den Granulozyten, dass mit steigender DHR-Spaltung die HE-Spaltung bei den Granulozyten signifikant zunimmt (Korrelation nach Pearson).

4.4 ROS-Bildung im Vergleich mit Kontrollpersonen

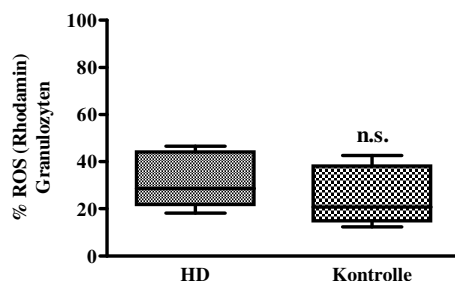
Um festzustellen, ob Dialysepatienten eine veränderte ROS-Bildung zeigen, haben wir 9 HD-Patienten mit jeweils einem nierengesunden Probanden, der nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen gematcht wurde, verglichen. Als Mass für die ROS-Bildung diente uns zum einen die Spaltung von DHR123 in Rhodamin und zum anderen die Spaltung von HE in Ethidiumbromid.

3. Tabelle: Probanden für die Bildung von ROS. Es handelt sich hierbei um Hämodialysepatienten (HD) und nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen gematchte nierengesunde Patienten (Kontrolle) aus der Augenklinik.

	HD (n = 9)	Kontrolle (n = 9)
Alter (Jahren)	65,66±12,37	66,42±12,46
Geschlecht	3w/6m	3w/6m
Diabetes mellitus (ja/nein)	2/9	2/9
Kardiovask. Ereignis (ja/nein)	4/9	4/9

4.4.1 Bestimmung der ROS-Bildung mit DHR

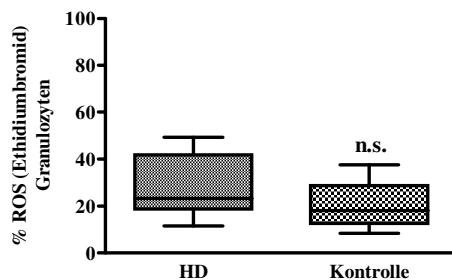
Es zeigte sich, dass bei den Rhodamin+ Granulozyten mit einer prozentualen ROS-Bildung von $31,5 \pm 1,0\%$ bei HD-Patienten gegenüber der gematchten Kontrollgruppe mit $24,7 \pm 11,9\%$ kein signifikanter Unterschied zu erkennen war ($p = 0,26$) (s. Abb. 17).



17. Abb.: DHR-Spaltung als Mass für die ROS-Bildung bei gematchten Paaren (n = 9). Für den Test wurden jeweils 100µl Vollblut nach einer Inkubation von 1h mit 2µM DHR+10ng PMA stimuliert. Es folgten eine weitere Inkubation und daran anschliessende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen. Im Vergleich der beiden gematchten Gruppen erkennt man, dass bei Rhodamin+ Granulozyten kein signifikanter Unterschied zu erkennen war. Dargestellt sind Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile. n.s. = $p > 0,05$ HD vs. Kontrolle (gepaarter t-Test).

4.4.2 Bestimmung der ROS-Bildung mit HE

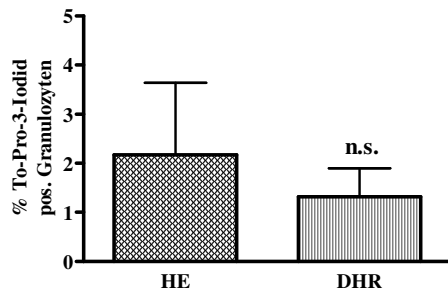
Bei der Spaltung von Hydroethidin in Ethidiumbromid zeigte sich, dass bei den Ethidiumbromid+ Granulozyten mit einem prozentualen Anteil der ROS-Bildung von $28,1 \pm 13,3\%$ bei HD-Patienten kein signifikanter Unterschied zur gematchten Kontrollgruppe mit $20,2 \pm 9,9\%$ zu erkennen ist ($p = 0,21$) (s. Abb. 18).



18. Abb.: HE-Spaltung als Mass für die ROS-Bildung bei gematchten Paaren ($n = 9$). Für den Test wurden jeweils 100µl Vollblut nach einer Inkubation von 1h mit 5µM HE+10ng PMA stimuliert. Es folgten eine weitere Inkubation und daran anschliessende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen. Im Vergleich der beiden gematchten Gruppen erkennt man, dass bei den Ethidiumbromid+ Granulozyten kein signifikanter Unterschied zu sehen ist. Dargestellt sind Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile. n.s. = $p > 0,05$ HD vs. Kontrolle (gepaarter t-Test).

4.4.3 To-Pro-3-Iodid positive Zellen bei HE und DHR

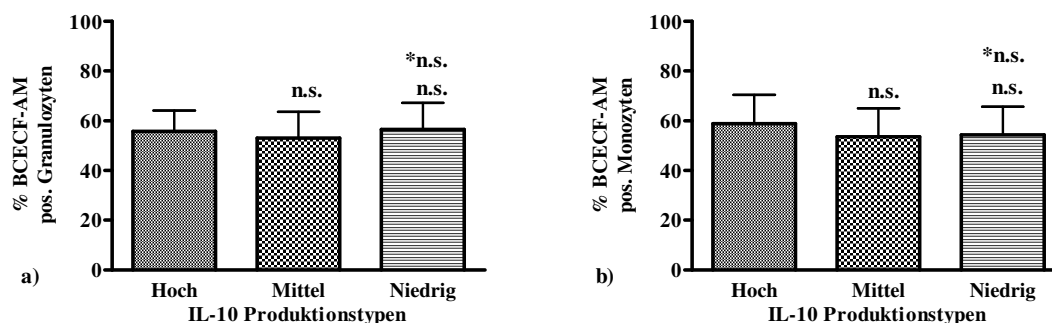
Um auszuschliessen, dass ein relevantes Absterben von Granulozyten und Monozyten während der ROS-Tests das Ergebnis verfälscht, wurden die Proben am Ende des Phagozytoseassays mit To-Pro3-Iodid versetzt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert. Wir untersuchten ein Kollektiv von 36 Probanden, darunter 27 HD-Patienten und 9 nierengesunde Kontrollpersonen. Es zeigte sich, dass bei den Granulozyten bei der Stimulation mit HE mit $2,2 \pm 1,5\%$ als auch DHR mit $1,3 \pm 0,6\%$, ein sehr geringer Anteil an To-Pro-3-Iodid positiven Zellen zu finden waren, ohne signifikanten Unterschied zwischen HE- und DHR-Messung ($p = 0,35$) (s. Abb. 19).



19. Abb.: To-Pro-3-Iodid positive Granulozyten bei der HE- bzw. DHR-Spaltung (n = 36). Für den Test wurden jeweils 100µl Vollblut nach einer Inkubation von 1h mit 2µM DHR+10ng PMA bzw. 5µM HE+10ng PMA stimuliert. Es folgten eine weitere Inkubation und daran anschliessende Lyse der Erythrozyten und Färbung der Zellen. Die Proben wurden am Ende des Phagozytoseassays mit 5µl To-Pro-3-Iodid (=50nmol/ml) versetzt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert. Bestimmt wurde die Anzahl der To-Pro-3-Iodid positiven Granulozyten als Mass für die toten Zellen. Es zeigten sich sehr niedrige Anteile an To-Pro-3-Iodid positiven Zellen bei den Granulozyten. Desweiteren war kein signifikanter Unterschied zwischen der Detektion mittels HE und DHR zu erkennen. Dargestellt sind $MW \pm SD$. n.s. = $p > 0,05$ HE vs. DHR (gepaarter t-Test).

4.5 Einfluss des IL-10 Genotyps auf Phagozytoseleistung

Die IL-10 Produktion ist genetisch determiniert. Man unterscheidet „Hoch-“, „Mittel-“ und „Niedrig-IL-10-Produktionstypen“. Um festzustellen, ob der IL-10 Genotyp einen Einfluss auf die Frequenz phagozytischer Granulozyten und Monozyten hat, wurde der IL-10 Genotyp von HD-Patienten ermittelt und anschliessend mit der Frequenz phagozytischer Zellen korreliert. In dem kleinen untersuchten Kollektiv (35 Patienten) konnte kein Zusammenhang zwischen IL-10 Genotyp und Phagozytoseleistung festgestellt werden (s. Abb. 20).



20. Abb.: % Anteil BCECF-AM positiver Zellen in Bezug zum IL-10 Produktionstyp (Hoch n = 6; Mittel n = 16; Niedrig n = 14). Es zeigte sich, dass der IL-10 Produktionstyp weder einen Einfluss auf den prozentualen Anteil der BCECF-AM positiven Granulozyten noch auf die BCECF-AM positiven Monozyten hat. Dargestellt sind $MW \pm SD$. n.s. = $p > 0,05$ Hoch vs. Mittel und Hoch vs. Niedrig; *n.s. = $p > 0,05$ Mittel vs. Niedrig (one way Anova mit Bonferroni als post test)

4.6 Regulation der Phagozytoseleistung durch antiinflammatorisches IL-10

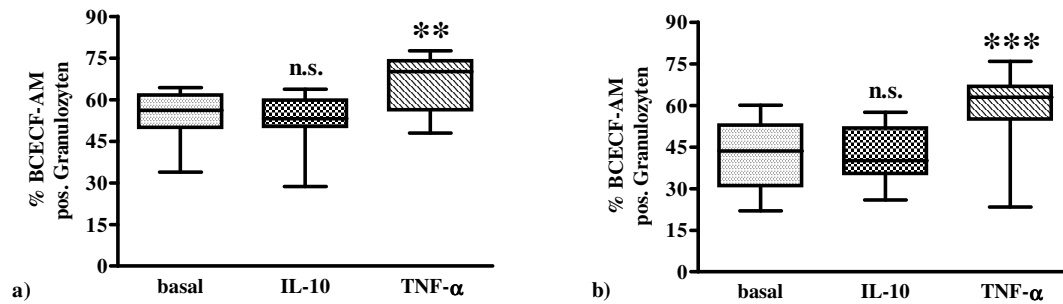
Des weiteren untersuchten wir die Auswirkungen von antiinflammatorischem IL-10 und proinflammatorischem TNF- α auf die Phagozytoseleistung, da Zytokine eine grosse Rolle bei der Regulation der Phagozytoseleistung spielen. Als Mass für die Phagozytoseleistung dienten uns die BCECF-AM positiven Zellen. Wir untersuchten 9 HD-Patienten im Vergleich zu einer nierengesunden gematchten Kontrollgruppe. HD-Patienten wurden jeweils mit einem nach Alter, Geschlecht Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen passenden nierengesunden Probanden aus der Augenklinik (Kontrolle) verglichen.

2. Tabelle: Probanden für die Stimulation mit IL-10 und TNF- α . Es handelt sich hierbei um Hämodialysepatienten (HD) und nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen gematchte nierengesunde Patienten (Kontrolle) aus der Augenklinik.

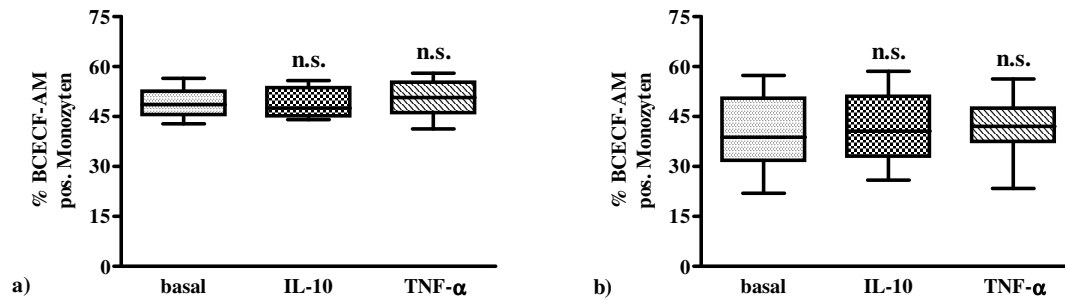
	HD (n = 9)	Kontrolle (n = 9)
Alter (Jahren)	62,3 \pm 8,9	61,8 \pm 17,3
Geschlecht	5w/4m	5w/4m
Diabetes mellitus (ja/nein)	3/9	3/9
Kardiovaskuläres Ereignis (ja/nein)	2/9	2/9

4.6.1 Einfluss von IL-10 auf die Phagozytoseleistung bei HD-Patienten und einer nierengesunden gematchten Kontrollgruppe

In unseren Versuchen zeigte sich ein erhöhtes Ausgangsniveau der prozentualen Phagozytoseleistung sowohl bei den Granulozyten mit 54,5 \pm 9,3% bei HD-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe mit 41,5 \pm 13,0% als auch bei den Monozyten mit 49,1 \pm 4,5% gegenüber 39,7 \pm 11,3%. Desweiteren zeigte sich bei den HD-Patienten eine signifikante Steigerung der Phagozytoseleistung bei den Granulozyten durch Stimulation mit TNF- α auf 65,9 \pm 10,2% ($p < 0,01$), während bei der nierengesunden Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung auf 58,6 \pm 9,4% zu beobachten war ($p < 0,001$). Bei den Monozyten zeigte die Stimulation mit TNF- α allerdings keinen Effekt gegenüber den basal-Werten (n.s.). Mit IL-10 konnte bei beiden Gruppen keine messbare Veränderung der Phagozytosewerte, weder bei den Granulozyten noch bei den Monozyten, gegenüber den basal-Werten gezeigt werden (n.s.) (s. Abb. 21+22).



21. Abb.: Phagozytoseleistung der Granulozyten der HD-Patienten (a) und der gematchten Kontrollgruppe (b) (n = 9). 100µl Vollblut wurden ohne Stimulus, mit IL-10 (40ng/ml) bzw. TNF-α (40ng/ml) 1h inkubiert. Im Anschluss daran folgten der Phagozytoseassay mit der Lyse der Erythrozyten und der Färbung mit den Antikörpern CD14 PerCP und CD16 PE. Dargestellt ist die Phagozytoseleistung der Granulozyten, die durchflusszytometrisch über SSC/CD16+ bestimmt wurde. Man erkennt höhere Werte der Phagozytoseleistung bei HD-Patienten im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe. Ebenfalls erkennt man bei beiden Gruppen die signifikant erhöhte Phagozytoseleistung nach der Stimulation mit TNF-α. Mit IL-10 ist allerdings kein Effekt zu erkennen. Dargestellt sind Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = $p > 0,05$ jeweils mit dem basal-Wert verglichen (one way Anova mit Bonferroni als post test).



22. Abb.: Phagozytoseleistung der Monozyten der HD-Patienten (a) und der gematchten Kontrollgruppe (b) (n = 9). 100µl Vollblut wurden ohne Stimulus, mit IL-10 (40ng/ml) bzw. TNF-α (40ng/ml) 1h inkubiert. Im Anschluss daran folgten der Phagozytoseassay mit der Lyse der Erythrozyten und der Färbung mit den Antikörpern CD14 PerCP und CD16 PE. Dargestellt ist die Phagozytoseleistung der Monozyten aller Probanden, die durchflusszytometrisch über SSC/CD14+ bestimmt wurde. Man erkennt höhere Werte der Phagozytoseleistung bei HD-Patienten im Vergleich zur gematchten Kontrollgruppe. Ebenfalls erkennt man, dass sowohl die Stimulation mit TNF-α als auch die Stimulation mit IL-10 keinen Effekt auf die Phagozytoseleistung der CD14+ Monozyten zeigen. Dargestellt sind Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile. n.s. = $p > 0,05$ jeweils mit dem basal-Wert verglichen (one way Anova mit Bonferroni als post test).

4.6.2 To-Pro-3-Iodid positive Zellen als Marker für nekrotische Zellen

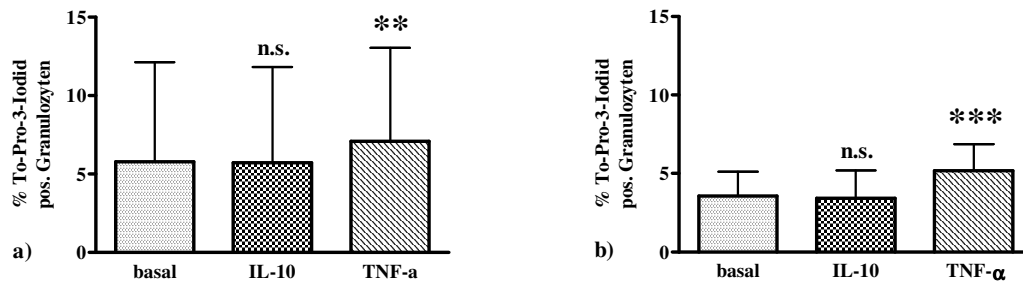
Um in unserem Versuchssystem den möglichen störenden Einfluss nekrotischer Zellen zu analysieren wurden die Proben mit einem Vitalfarbstoff (To-Pro-3-Iodid) angefärbt. Dieser Farbstoff färbt lediglich tote Zellen an. Die Proben wurden am Ende des Phagozytoseassays mit To-Pro-3-Iodid versetzt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert.

Bei der untersuchten Gruppe handelt es sich um Hämodialysepatienten (HD) und nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen gematchte nierengesunde Patienten (Kontrolle) aus der Augenklinik.

Der Anteil To-Pro-3-Iodid positiver Granulozyten war unter Stimulation mit TNF-α signifikant erhöht im Vergleich zu unstimulierten bzw. IL-10 stimulierten Proben (HD:

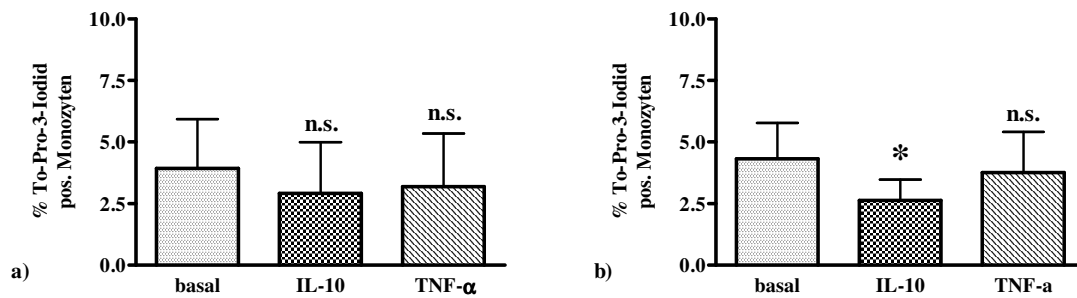
$p < 0,01$; Kontrolle $p < 0,001$). Dieses Ergebnis zeigte sich bei beiden untersuchten Kollektiven (s. Abb. 23):

- a) HD-Patienten: basal $5,8 \pm 6,3\%$ vs. IL-10 $5,7 \pm 6\%,1$ vs. TNF- α $7,1 \pm 6,0\%$
- b) gematchte Kontrollgruppe: basal $3,6 \pm 1,5\%$ vs. IL-10 $3,4 \pm 1,8\%$ vs. TNF- α $5,2 \pm 1,7\%$



23. Abb.: To-Pro-3-Iodid positive Granulozyten der HD-Patienten (a) und der gematchten Kontrollgruppe (b) (n = 9). Die Proben wurden am Ende des Phagozytoseassays mit 5 μ l To-Pro-3-Iodid (=50nmol/ml) versetzt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert. Bestimmt wurde die Anzahl der To-Pro-3-Iodid positiven CD16+-Granulozyten als Mass für die toten Zellen. Man erkennt signifikant höhere Werte der To-Pro-3-Iodid positiven Granulozyten nach Stimulation mit TNF- α im Vergleich zu den basal-Werten. Bei den IL-10 stimulierten Proben erkennt man bei beiden Gruppen keinen Einfluss von IL-10 auf den prozentualen Anteil an To-Pro-3-Iodid positiven Zellen. Dargestellt sind MW \pm SD. ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, n.s. = $p > 0,05$ jeweils mit dem basal-Wert verglichen (one way Anova mit Bonferroni als post test).

Bei der Analyse der To-Pro-3-Iodid positiven Monozyten konnte kein TNF- α vermittelter Nekrose-Effekt festgestellt werden. Innerhalb des nierengesunden Kontrollkollektivs war eine signifikante Verringerung der Nekrose bei IL-10 stimulierten Proben messbar (basal $4,3 \pm 1,5\%$ vs. IL-10 $2,6 \pm 0,8\%$; $p < 0,05$) (s. Abb. 24).



24. Abb.: To-Pro-3-Iodid positive Monozyten der HD-Patienten (a) und der gematchten Kontrollgruppe (b) (n = 9). Die Proben wurden am Ende des Phagozytoseassays mit 5µl ToPro-3-Iodid (= 50nmol/ml) versetzt und innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert. Bestimmt wurde die Anzahl der To-Pro-3-Iodid positiven CD16+-Granulozyten als Mass für die nekrotischen Zellen. In der Kontrollgruppe fand man durch die Stimulation mit IL-10 signifikant weniger To-Pro-3-Iodid positive Monozyten im Vergleich zu den basal-Werten. Alle anderen Ergebnisse zeigen keine signifikante Veränderung. Dargestellt sind MW±SD. * = $p < 0,05$, n.s. = $p > 0,05$ jeweils mit dem basal-Wert verglichen (one way Anova mit Bonferroni als post test).

Vergleicht man die basal-Werte und die Werte nach Stimulation mit IL-10 bzw. TNF-α der HD-Patienten mit den Werten der Kontrollgruppe so zeigt sich kein signifikanter Unterschied der To-Pro-3-Iodid positiven Zellen (one way ANOVA, n.s.) weder bei den Granulozyten noch bei den Monozyten (s. Abb. 23+24).

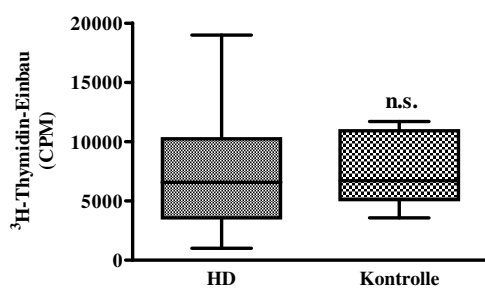
4.7 Proliferations-Assay

Neben Phagozytoseleistung, als Teil der unspezifische zellulären Immunantwort spielt die T-Zell vermittelte Immunität bei der spezifischen Immunantwort eine wichtige Rolle. Die Teilungsfähigkeit von T-Zellen stellt dabei ein aussagekräftiges Mass für die zelluläre Immunantwort dar. Eine Möglichkeit, die T-Zell-Proliferation als Antwort auf eine spezifische Stimulation zu bestimmen, ist der Thymidin-Assay, eine radioaktive Methode, bei der ^3H -Thymidin in neu synthetisierte DNA nach polyklonaler PHA-Stimulation eingebaut und bestimmt wird. Der Thymidineinbau liefert dabei einen quantitativen Wert

für die DNA-Syntheserate, die direkt proportional zur Zellteilungsrate ist und uns als Mass für die spezifische Immunantwort dient. Die Messung erfolgte mittels eines MikroBeta Counters.

4.7.1 T-Zell-Proliferation bei HD-Patienten im Vergleich zu einer nierengesunden Kontrollgruppe

Bei einem Kollektiv von 36 HD-Patienten im Vergleich zu 10 nierengesunden Kontrollpersonen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bei der Messung der T-Zell-Proliferation (HD 7157 ± 4952 CPM vs. Kontrolle 7498 ± 2887 CPM; $p = 0,84$) (s. Abb. 25).



25. Abb.: T-Zell-Proliferation bei HD-Patienten (n = 36) im Vergleich zu einer nierengesunden Kontrollgruppe (n = 10). Die T-Zell-Proliferation wurde mittels Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt und in einem MikroBeta Counter gemessen. Es zeigte sich im Vergleich der beiden Kollektive kein signifikanter Unterschied. Dargestellt sind Box plots mit dem Median und der 25./75. Perzentile. n.s. = $p > 0,5$ (gepaarter t-Test).

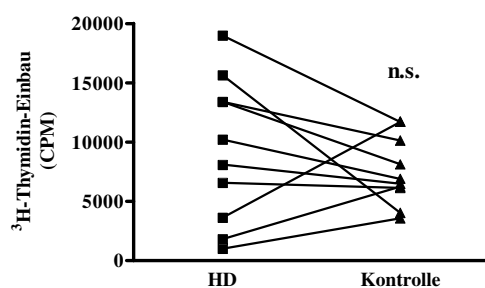
4.7.2 Proliferation bei HD-Patienten im Vergleich zu einer gematchten Kontrollgruppe

Um eine bessere Aussage über einen möglichen Unterschied in der T-Zell-Proliferation zwischen HD-Patienten und einer nierengesunden Kontrollgruppe zu machen, stellten wir 10 HD-Patienten jeweils gematchte nierengesunde Kontrollpersonen aus der Augenklinik gegenüber. Die Paare wurden nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulärem Ereignis gematcht.

4. Tabelle: Probanden für die T-Zellproliferation. Es handelt sich hierbei um Hämodialysepatienten (HD) und nach Alter, Geschlecht, Diabetes mellitus und kardiovaskulären Ereignissen gematchte nierengesunde Patienten (Kontrolle) aus der Augenklinik.

	HD (n = 10)	Kontrolle (n = 10)
Alter (Jahre)	64,8±12,2	65,8±11,9
Geschlecht	4w/6m	4w/6m
Diabetes mellitus (ja/nein)	5/10	5/10
Kardiovask. Ereignis (ja/nein)	5/10	5/10

Es zeigte sich auch bei der Auswertung der gematchten Paare kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die T-Zell-Proliferation ($p = 0,35$) (s. Abb. 26).



26. Abb.: T-Zell-Proliferation bei HD-Patienten im Vergleich zu einer nierengesunden gematchten Kontrollgruppe (n = 10). Die T.Zell-Proliferation wurde mittels Einbau von ^3H -Thymidin bestimmt und in einem MikroBeta Counter gemessen. Es zeigte sich im Vergleich der beiden Kollektive kein signifikanter Unterschied. n.s. = $p > 0,5$ (gepaarter t-Test)

5 DISKUSSION

Infektionen sind eine der führenden Ursachen für die erhöhte Morbidität und Mortalität bei chronischen Hämodialysepatienten. Gemäss USRDS (United States Renal Data System) betrug der Anteil an den Todesursachen (nicht korrigiert für andere Risikofaktoren) 13,5% (USRDS, 2007). Die Gründe hierfür sind multifaktoriell bedingt und bisher noch nicht komplett geklärt. Insbesondere scheinen Immundefunktionsstörungen - die die angeborene unspezifische, als auch die zellulär spezifische Immunantwort gleichermaßen betreffen - zu der hohen Mortalitätsrate in diesem Patientenkollektiv beizutragen.

5.1 Phagozytoseleistung bei HD-Patienten

Granulozyten, Monozyten/Makrophagen gehören zu den funktional wichtigsten zellulären Bestandteilen der angeborenen unspezifischen Immunantwort. Eine ihrer Hauptaufgaben besteht in der Elimination bakterieller Erreger durch Phagozytose.

Um die Phagozytoseleistung in unterschiedlichen Kollektiven zu bestimmen, haben wir einen spezifischen durchflusszytometrischen Assay eingesetzt. Die Beurteilung der Phagozytoseleistung besteht in der potentiellen Aufnahme/Phagozytose von exogen angebotenen BCECF-AM gelabelten *Staph. aureus*. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass HD-Patienten im Vergleich zu einer nach Alter, Geschlecht sowie Prävalenz von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gematchten nierengesunden Kontrollgruppe eine vergleichbare Phagozytoseleistung aufwiesen.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Arbeiten von Anding (2003), Gastaldello (2000) und Iida (1997). Alle diese Autoren kommen mit methodisch ähnlichen Ansätzen zur Bestimmung der Phagozytoseleistung - durchflusszytometrische Analyse der Phagozytose von *Candida albicans* durch Granulozyten (Anding) bzw. *E. coli* (Gastadello, Iida) - zu dem gleichen Ergebnissen wie wir. Neu an unserer Arbeit ist, im Gegensatz zu Anding und Gastaldello, die Verwendung *Staph. aureus* zur Bestimmung der Phagozytoseleistung. Dies ist unserer Meinung nach ein wichtiger Punkt, da *Staph. aureus* der häufigste bakterielle Erreger in klinischen Isolaten von HD-Patienten ist.

Sardenberg et al (2005), Vanholder (1993) und Alexiewicz (1991) hingegen berichten von einer verminderten Phagozytoseleistung bei HD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Interessanterweise bestimmten auch Sardenberg et al (2004, 2005) die Phagozytoseleistung von HD-Patienten (n = 14) und gesunden Kontrollen (n = 14) mit einem durchflusszytometrischen Assay. Im Gegensatz zu unserer Arbeit waren die untersuchten Kollektive jedoch nicht gematcht, lediglich Patienten mit Diabetes mellitus wurden ausgeschlossen. In früheren Arbeiten kamen auch Alexiewicz et al (1991) und Vanholder et al (1993) zu ähnlichen Ergebnissen wie die Arbeitsgruppe um Sardenberg. Beide stützen sich jedoch auf andere Verfahren zur Bestimmung der Phagozytoseleistung. Alexiewicz et al untersuchten diese bei 37 HD-Patienten gegenüber 48 gesunden Kontrollpersonen mittels spektrophotometrischer Analyse. Hierbei bestimmten sie die Phagozytoseleistung von Oil-Red-O gefärbten *E. coli* Lipopolysacchariden durch isolierte Granulozyten. Ähnlich wie bei der Studie von Sardenberg wurden die untersuchten Kollektive nicht gematcht. Ausserdem wurden bei 12 Patienten der bestehende Diabetes mellitus, sowie bei HD-Patienten kardiovaskuläre Ereignisse in der Vorgeschichte, als mögliche Einflüsse auf die Phagozytoseleistung nicht berücksichtigt. Damit ist nicht auszuschliessen, dass allein schon der Diabetes mellitus per se zu einer schlechteren Phagozytoseleistung gegenüber einem gesunden Probanden führt und nicht die Dialyse als Hauptursache auszumachen ist. Eine schlechtere Phagozytoseleistung bei Patienten mit Diabetes mellitus konnten bereits Delamaire et al 1997 sowie Marhoffer et al 1992 zeigen. Zudem kann der Einfluss der Dialysemembranen nicht beurteilt werden, da darüber in der Arbeit keine Angaben gemacht wurden. Auch Vanholder et al (1993) zeigten bei 64 HD-Patienten gegenüber 34 gesunden Kontrollen eine erniedrigte Phagozytoseleistung. Allerdings wurde die Phagozytoseaktivität nur indirekt durch Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion während der Metabolisierung radioaktiv markierter Glukose durch Phagozyten bestimmt. Ein weiterer Punkt ist, dass auch hier die beiden Kollektive nicht gematcht wurden. Lediglich Patienten mit Diabetes mellitus wurden wie bei Sardenberg ausgeschlossen. Diese unterschiedliche Begleitfaktoren wie Alter, Diabetes mellitus oder kardiovaskuläre Erkrankungen können einen wesentlichen Einfluss auf das zelluläre Geschehen haben. Daher ist es nach unserem Erachten essentiell, Patienten und Kontrollkohorte diesbezüglich aufeinander abzustimmen, um die Bedeutung der Urämie an der Immundefunktionsstörung besser einschätzen zu können.

5.2 Bildung Reaktiver Sauerstoffspezies bei HD-Patienten

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen bei metabolischen Prozessen, wie z.B. der Phagozytose in der Zelle. Ein Zusammenhang zwischen Phagozytoseleistung einerseits und ROS-Bildung andererseits war somit zu erwarten und konnte als positive Korrelation in unseren Studien bestätigt werden. ROS sollen in geringen Konzentrationen als physiologische Mediatoren der Immunantwort wirken, während höhere Konzentrationen mit verschiedenen Formen von Zellschäden in Verbindung gebracht werden.

Zur Messung der Bildung der ROS verwendeten wir eine spezifische FACS-Analyse und untersuchten die Spaltung von Dihydrorhodamin in Rhodamin, sowie die Spaltung von Hydroethidin (HE) in Ethidiumbromid. In unserer Untersuchung zeigte sich, dass HD-Patienten eine vergleichbare ROS-Bildung gegenüber einer nach Alter, Geschlecht sowie Prävalenz von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gematchten nierengesunden Kontrollgruppe aufwiesen.

Im Einklang mit den bereits erwähnten Studien zur Phagozytoseleistung finden Anding et al (2003), Gastaldello et al (2000) und Iida et al (1997) ebenfalls keinen Unterschied bei der ROS-Bildung zwischen HD-Patienten und gesunden Kontrollen. Anding und Gastaldello bestimmten die ROS-Bildung wie wir durchflusszytometrisch im Vollblut mittels DHR-Spaltung. Aber auch Iida et al zeigten mit einer anderen Methode, dass PMA stimulierte Zellen keine signifikant veränderte ROS-Bildung gegenüber der gesunden Kontrollgruppe aufweisen. Interessanterweise fanden auch Sardenberg et al bzgl. der ROS-Bildung keinen Unterschied zwischen Patienten- und Kontrollkohorte, obwohl beide Kollektive bzgl. ihrer Phagozytoseleistung differierten (2004, 2005). Jedoch zeigten die gleichen Autoren auch, dass die Wahl des Stimulus, der für ROS-Messung eingesetzt wird, einen Einfluss auf die Ergebnisse haben kann. Ein zu unseren Daten vergleichbares Ergebnis erhielt Sardenberg, wenn PMA als Stimulus eingesetzt wurde. Eine Analyse der ROS-Bildung mit anderen Stimuli (fMLP, *Staph. aureus*) führte zu kontroversen Ergebnissen, deren Ursachen in der Arbeit nicht näher erläutert wurden. Da wir keine eigenen Untersuchungen zur ROS-Bildung mit diesen Stimuli (fMLP, *Staph. aureus*) gemacht haben, bleibt die Einordnung dieser Ergebnisse unklar.

5.3 IL-10 Genotyp und Einfluss des antiinflammatorischen IL-10 auf die Phagozytoseleistung bei HD-Patienten

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielen Zytokine. Man unterscheidet zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. Proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α setzen zu Beginn einer Immunabwehr eine entzündliche Reaktion in Gang und machen Abwehrzellen auf Eindringlinge von aussen aufmerksam, so dass weitere Immunzellen an den Ort des Geschehens gelangen. Mit erfolgreich abgeschlossener Immunabwehr sollte dann die Entzündung beendet werden. Dafür sorgen unter anderem die antiinflammatorischen Zytokine. Diese wirken begrenzend und hemmend auf Abwehrvorgänge und verhindern übersteigerte Entzündungsprozesse. Wenn allerdings das Zusammenspiel dieser pro- und antiinflammatorischen Zytokine nicht funktioniert, kommt es zu Störungen der Immunabwehr. Die Immunantworten von Hämodialysepatienten sind durch eine geringgradige systemische Entzündungsreaktion gekennzeichnet, die ein Ungleichgewicht in der Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vermuten lässt. Es wird diskutiert, dass Blutkontakt mit der Dialysemembran bei der Dialyse zu veränderten Zytokinspiegeln und Wirkungen und dies zu einer Beeinflussung der Immunantwort bei HD-Patienten führt. Eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF- α bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen wurde bereits mehrfach beschrieben (Rysz, 2006; Rostaing, 2000; Girndt, 1995/1998; Descamps-Latscha, 1995; Pereira, 1994). Dies spricht ebenfalls für eine veränderte Aktivität des antiinflammatorischen Systems. Gerade bei niereninsuffizienten Patienten unter Hämodialyse und chronischer systemischer Inflammation kommt dem antiinflammatorischen Zytokin IL-10 eine besondere Bedeutung bei der Immunantwort zu. IL-10 zählt zu den wichtigsten Faktoren, um eine Entzündungsreaktion zu begrenzen und zu beenden, indem es als antiinflammatorisches Zytokin die Transkription und Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine in Monozyten vermindert (Moor, 1993; De Waal Malefyt, 1991). Perianayagam et al (2002) zeigten, dass die IL-10 Synthese bei HD-Patienten erniedrigt ist. Sie unterstützen die These, dass diese verminderte IL-10 Synthese zu einer unzureichenden Hemmung proinflammatorischer Zytokine und damit zu einem chronischen Entzündungsstadium

führt. Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur aber auch Hinweise, dass HD-Patienten ihre Produktion von antiinflammatorischem IL-10 erhöhen, um eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen zu verhindern (Borazan, 2004; Brunet, 1998; Morita, 1997). Da die individuelle Höhe der IL-10 Serum-Spiegel genetisch bedingt ist, untersuchten wir, ob der IL-10 Genotyp einen Einfluss auf die Phagozytoseleistung hat. Dazu bestimmten wir den IL-10-Genotyp bei HD-Patienten und setzten die Produktionstypen in Beziehung zu unseren Ergebnissen der Phagozytoseleistung. Es zeigte sich jedoch kein erkennbarer Zusammenhang der Phagozytoseleistung zum IL-10 Genotyp.

Jaber et al (2003) allerdings berichteten bereits, dass bei Patienten mit akuten Nierenerkrankungen, der IL-10-Niedrig-Produktionstyp mit einem erhöhten Sterblichkeitsrisiko assoziiert ist. Eine schlechtere Prognose bei HD-Patienten mit IL-10-Niedrig-Produktionstyp kann allerdings durch andere Faktoren, wie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei HD-Patienten mit dem IL-10-Niedrig-Produktionstyp (Girndt, 2002/2003), erklärbar sein. Auch bereits 2001 haben Girndt et al gezeigt, dass die Ausprägung der Immunantwort auf Hepatitis Impfung mit unterschiedlichen IL-10 Genotypen assoziiert ist. Patienten mit IL-10-Hoch-Produktions-Genotyp zeigten eine bessere Impfantwort als Personen, die weniger IL-10 produzieren. Zusätzlich vertreten Girndt et al (2006) die These, dass HD-Patienten mit dem IL-10-Niedrig-Produktions-Genotyp eine bessere Abwehr gegenüber bakteriellen Infektionen zeigen. Sie zeigten bei 128 HD-Patienten, dass Leukozytose und CRP-Serumkonzentration während bakterieller Infektionen signifikant höher bei Patienten mit dem IL-10-Niedrig- gegenüber Patienten mit dem IL-10-Hoch-Produktions-Genotyp sind. Dies muss kein Widerspruch an sich sein, da Mechanismen gegen virale Antigene sich wesentlich gegenüber der Abwehr bakterieller Infektionen unterscheiden.

Für eine Studie zur Beurteilung des IL-10 Polymorphismus ist unser Kollektiv an HD-Patienten mit 36 Probanden relativ klein. Da wir jedoch keine Tendenz erkennen konnten, ist auch bei einem grösseren Kollektiv kein anderes Ergebnis zu erwarten. Um einen auf Grunde des geringen Kollektivs nicht erfassten Einfluss von IL-10 auf die Phagozytoseleistung auszuschliessen, untersuchten wir zusätzlich den Einfluss des IL-10 auf die unspezifische Immunantwort in vitro. Dazu untersuchten wir die Phagozytoseleistung von Granulozyten und monozytären Zellen unter basalen und

stimulierten Bedingungen. Zur Validierung des Assay wurde das proinflammatorische Zytokin $\text{TNF-}\alpha$ eingesetzt. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der basalen Phagozytoseleistung durch $\text{TNF-}\alpha$, sowohl bei HD-Patienten als auch bei einer nach Alter, Geschlecht sowie Prävalenz von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gematchten nierengesunden Kontrollgruppe. Dies ist vereinbar mit der proinflammatorischen Funktion des $\text{TNF-}\alpha$, eine Entzündungsreaktion in Gang zu setzen. Einen Effekt des antiinflammatorischen IL-10 auf die basale Phagozytoseleistung konnten wir bei beiden Kollektiven nicht nachweisen. Kontrovers wurde der Einfluss von IL-10 auf die Phagozytoseleistung bereits von einer Arbeitsgruppe um Roilides diskutiert. Entscheidend für die Wirkung von IL-10 auf die Phagozytoseleistung ist laut dieser Autoren die Inkubationsdauer. Während längere Inkubationszeiten (2-24h) keine Veränderung der Phagozytoseleistung zeigten, führte eine Inkubation für 1h mit IL-10 zu einer signifikanten Erniedrigung der Phagozytoseleistung. Einen Einfluss der Inkubationszeit auf die Phagozytoseleistung konnten wir nicht nachvollziehen. In unseren Vorversuchen zeigte sich sowohl nach einer 1h- als auch nach einer 24h-Inkubation kein Effekt des IL-10 auf die Phagozytoseleistung.

Zu diskutieren wäre vielmehr ob ein anderer experimenteller Ansatz, der möglicherweise dem biologischen Regelkreis von inflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokinsekretion näher kommt, einen indirekten Einfluss von IL-10 auf die Phagozytoseleistung nachweisen könnte. Das heisst, es wäre zu testen, ob nach LPS-Induktion eine erhöhte Phagozytoseleistung zu messen und diese durch eine zeitlich versetzte IL-10 Zugabe wiederum zu senken wäre.

5.4 T-Zellproliferation bei HD-Patienten

Da wir mit unseren bisherigen Ergebnissen zeigen konnten, dass die Phagozytoseleistung als Teil der unspezifischen Immunantwort bei HD-Patienten mit der von gematchten nierengesunden Kontrollen vergleichbar ist, stellte sich uns die Frage, inwieweit das spezifische Immunsystem Veränderungen zeigt. Für die spezifische Immunantwort sind vor allem die Lymphozyten (T- und B-Zellen) verantwortlich. Viele Antigene werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) verarbeitet und den T-Helferzellen präsentiert.

Diese interagieren mit den B-Zellen und induzieren eine Immunantwort. Die Interaktion zwischen Antigen präsentierenden Zellen und T-Helferzellen ist relativ stör anfällig. Man vermutet, dass Immundefekte bei Nierenkranken eher auf Störungen der T-Zell-Funktion bzw. Proliferation oder der APC, als der B-Zell-Funktion zurückzuführen sind (Girndt, 2002). Frühere Studien zeigten, dass Impfungen mit Hepatitis B (Köhler, 1984), Influenza (Rautenberg, 1989), Tetanus (Girndt, 1995) und Diphtherie (Kreft, 1997) eine schlechtere Impfantwort als Impfungen mit Polysaccharid Antigenen wie Pneumokokken (Friedman, 1980) haben. Dies könnte daran liegen, dass bakterielle Antigene, wie z.B. Polysaccharid Antigene direkt B-Zellen zur Antikörper Produktion aktivieren und im Gegensatz zu viralen Antigenen unabhängig von der stör anfälligen Interaktion zwischen Antigen präsentierenden Zellen und T-Helferzellen sind.

Um eine eventuelle Störung im spezifischen Immunsystem bei HD-Patienten zu untersuchen, bestimmten wir die T-Zell-Proliferation mittels eines ^3H -Thymidin-Assays. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass HD-Patienten im Vergleich zu einer nach Alter, Geschlecht sowie Prävalenz von Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen gematchten nierengesunden Kontrollgruppe eine vergleichbare T-Zell-Proliferation aufweisen. Somit zeigte sich, dass sowohl die Phagozytoseleistung als Teil der unspezifischen, als auch die T-Zell-Proliferation als Teil der spezifischen Immunantwort bei HD-Patienten mit der Immunantwort von nierengesunden Kontrollen vergleichbar ist. Bereits Kaul et al (2000) beschreiben in ihrer Arbeit einen positiven Effekt der Hämodialyse auf die T-Zell-Proliferation bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen. Diese zeigen vor Beginn der Dialyse eine signifikant schlechtere T-Zell-Proliferation gegenüber sechs Wochen nach Einleitung einer dauerhaften Dialysebehandlung. Ältere Arbeiten von Girndt et al (1993) und Ankersmit et al (2000) zeigten dagegen mit ähnlichen Methoden eine reduzierte T-Zell-Proliferation bei HD-Patienten. Girndt et al bestimmten eine verminderte Proliferation von 24 HD-Patienten gegenüber 12 gesunden Kontrollpersonen. Die beiden Gruppen wurden im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau nicht gematcht. Auch die Arbeitsgruppe um Ankersmit konnte eine verminderte T-Zell-Proliferation von 20 HD-Patienten gegenüber 15 nach Alter und Geschlecht gematchten Kontrollen nachweisen. Im Vergleich der beiden Gruppen wurden sowohl bei Girndt et al als auch bei Ankersmit et al Einflüsse von Diabetes mellitus sowie kardiovaskulären Ereignissen nicht berücksichtigt. Ein exaktes Matching ist unseres

Erachtens essentiell, da verschiedene Erkrankungen u.a. Diabetes mellitus einen signifikanten Einfluss auf die T-Zell-Proliferation haben (Buchs, 2000; Chang, 1995).

Abschliessend lassen die Verbesserung der Dialysequalität durch die Verwendung von neueren biokompatibleren Membranen (Banche, 2006), die Verbesserung der Wasserqualität (Hoenich, 2006; Ward, 2005; Lonnemann, 2004) und bessere Hygienemassnahmen die These zu, dass dies zu Verbesserungen sowohl des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystem bei HD-Patienten geführt haben könnte und somit die Immunantwort bei HD-Patienten im Vergleich zu früheren Jahren weniger beeinträchtigt ist.

6 LITERATURVERZEICHNISS

1. Alexiewicz, J. M. et al. "Impaired phagocytosis in dialysis patients: studies on mechanisms." *Am.J.Nephrol.* 11.2 (1991): 102-11.
2. Anding, K. et al. "The influence of uraemia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing." *Nephrol.Dial.Transplant.* 18.10 (2003): 2067-73.
3. Ankersmit, H. J. et al. "Impaired T cell proliferation, increased soluble death-inducing receptors and activation-induced T cell death in patients undergoing haemodialysis" *Clin.Exp.Immunol.* 125.1 (2001): 142-48.
4. Balakrishnan, V. S. et al. "Cytokine gene polymorphisms in hemodialysis patients: association with comorbidity, functionality, and serum albumin" *Kidney Int.* 65.4 (2004): 1449-60.
5. Banche, G. et al. "Effect of dialysis membrane biocompatibility on polymorphonuclear granulocyte activity in dialysis patients." *Nephrol.Dial.Transplant.* 21.12 (2006): 3532-38.
6. Borazan, A. et al. "The effects of peritoneal dialysis and hemodialysis on serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive-protein levels" *Mediators.Inflamm.* 13.3 (2004): 201-04.
7. Brunet, P. et al. "IL-10 synthesis and secretion by peripheral blood mononuclear cells in haemodialysis patients." *Nephrol.Dial.Transplant.* 13.7 (1998): 1745-51.

8. Buchs, A. E. and M. J. Rapoport. "T cell signaling and autoimmune diabetes"
J.Pediatr.Endocrinol.Metab 13.9 (2000): 1549-54.
9. Chang, F. Y. and M. F. Shaio. "Decreased cell-mediated immunity in patients with
non-insulin-dependent diabetes mellitus" Diabetes Res.Clin.Pract. 28.2
(1995): 137-46.
10. Cohen, G., M. Haag-Weber, and W. H. Horl. "Immune dysfunction in uremia."
Kidney Int.Suppl 62 (1997): S79-S82.
11. de Waal, Malefyt R. et al. "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by
human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by
monocytes." J.Exp.Med. 174.5 (1991): 1209-20.
12. Delamaire, M. et al. "Impaired leucocyte functions in diabetic patients"
Diabet.Med. 14.1 (1997): 29-34.
13. Descamps-Latscha, B. et al. "Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their
specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis.
Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes."
J.Immunol. 154.2 (1995): 882-92.
14. Emmendorffer, A. et al. "A fast and easy method to determine the production of
reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using
dihydrorhodamine 123." J.Immunol.Methods 131.2 (1990): 269-75.
15. Fiorentino, D. F., M. W. Bond, and T. R. Mosmann. "Two types of mouse T helper
cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1
clones." J.Exp.Med. 170.6 (1989): 2081-95.

16. Friedman, E. A. et al. "Intact antibody response to pneumococcal capsular polysaccharides in uremia and diabetes." *JAMA* 244.20 (1980): 2310-11.
17. Gallagher, P. M. et al. "Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia" *Thorax* 58.2 (2003): 154-56.
18. Gastaldello, K. et al. "Role of complement and platelet-activating factor in the stimulation of phagocytosis and reactive oxygen species production during haemodialysis." *Nephrol.Dial.Transplant.* 15.10 (2000): 1638-46.
19. Girndt, M. "Humoral immune responses in uremia and the role of IL-10." *Blood Purif.* 20.5 (2002): 485-88.
20. Girndt, M., G. H. Heine, and H. Kohler. "Gene polymorphism association studies in dialysis: anemia and host immunity" *Semin.Dial.* 19.3 (2006): 227-31.
21. Girndt, M. et al. "Anti-inflammatory interleukin-10 genotype protects dialysis patients from cardiovascular events" *Kidney Int.* 62.3 (2002): 949-55.
22. Girndt, M. et al. "T cell activation defect in hemodialysis patients: evidence for a role of the B7/CD28 pathway" *Kidney Int.* 44.2 (1993): 359-65.
23. Girndt, M. et al. "Production of interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in vitro correlates with the clinical immune defect in chronic hemodialysis patients." *Kidney Int.* 47.2 (1995): 559-65.
24. Girndt, M., M. Pietsch, and H. Kohler. "Tetanus immunization and its association to hepatitis B vaccination in patients with chronic renal failure." *Am.J.Kidney Dis.* 26.3 (1995): 454-60.

25. Girndt, M. et al. "Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia." *Kidney Int.Suppl* 78 (2001): S206-S211.
26. Girndt, M. et al. "Production of proinflammatory and regulatory monokines in hemodialysis patients shown at a single-cell level" *J.Am.Soc.Nephrol.* 9.9 (1998): 1689-96.
27. Girndt, M. et al. "The interleukin-10 promoter genotype determines clinical immune function in hemodialysis patients." *Kidney Int.* 60.6 (2001): 2385-91.
28. Girndt, M. et al. "Uremia-associated immune defect: the IL-10-CRP axis" *Kidney Int.Suppl.* 84 (2003): S76-S79.
29. Halma, C. et al. "Does haemodialysis impair macrophage Fc receptor function?" *Nephrol.Dial.Transplant.* 7.7 (1992): 618-22.
30. Herbelin, A. et al. "Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha." *Kidney Int.* 37.1 (1990): 116-25.
31. Hoenich, N. A., C. Ronco, and R. Levin. "The importance of water quality and haemodialysis fluid composition." *Blood Purif.* 24.1 (2006): 11-18.
32. Iida, T. et al. "Polymorphonuclear cells in chronic hemodialysis patients have intact phagocytotic and impaired bactericidal activities." *Nephron* 75.1 (1997): 41-47.
33. Jaber, B. L. et al. "Cytokine gene promoter polymorphisms and mortality in acute renal failure" *Cytokine* 25.5 (2004): 212-19.

34. Janeway, CA. Immunologie. 5. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002.
35. Kaul, H. et al. "Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T-cell activation in patients with end-stage renal disease" Am.J.Kidney Dis. 35.4 (2000): 611-16.
36. Kim, J. M. et al. "Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes." J.Immunol. 148.11 (1992): 3618-23.
37. Knerr, K. et al. "Chronic inflammation and hemodialysis reduce immune competence of peripheral blood leukocytes in end-stage renal failure patients." Cytokine 30.3 (2005): 132-38.
38. Kohler, H. et al. "Active hepatitis B vaccination of dialysis patients and medical staff." Kidney Int. 25.1 (1984): 124-28.
39. Kreft, B. et al. "Low efficiency of active immunization against diphtheria in chronic hemodialysis patients." Kidney Int. 52.1 (1997): 212-16.
40. Lewis, S. L. and D. E. Van Epps. "Neutrophil and monocyte alterations in chronic dialysis patients." Am.J.Kidney Dis. 9.5 (1987): 381-95.
41. Löffler, G and PE. Petrides. Biochemie und Pathobiochemie. 6.Aufl. Springer. Berlin. 1998.
42. Lonnemann, G. "When good water goes bad: how it happens, clinical consequences and possible solutions." Blood Purif. 22.1 (2004): 124-29.

43. Macdonald, C. et al. "Production of tumor necrosis factor alpha and hemodialysis." *Nephron* 65.2 (1993): 273-77.
44. Marhoffer, W. et al. "Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes" *Diabetes Care* 15.2 (1992): 256-60.
45. Martin, E. and S. Bhakdi. "Flow cytometric assay for quantifying opsonophagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by peripheral blood leukocytes" *J.Clin.Microbiol.* 30.9 (1992): 2246-55.
46. McKenna, R. M. et al. "Increased production of tumor necrosis factor activity by hemodialysis but not peritoneal dialysis patients." *Nephron* 67.2 (1994): 190-96.
47. Montgomerie, J. Z., G. M. Kalmanson, and L. B. Guze. "Renal failure and infection." *Medicine (Baltimore)* 47.1 (1968): 1-32.
48. Moore, K. W. et al. "Interleukin-10" *Annu.Rev.Immunol.* 11 (1993): 165-90.
49. Moore, K. W. et al. "Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1." *Science* 248.4960 (1990): 1230-34.
50. Morita, Y. et al. "Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis patients" *Res.Commun.Mol.Pathol.Pharmacol.* 98.1 (1997): 19-33.
51. Pereira, B. J. et al. "Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients." *Kidney Int.* 45.3 (1994): 890-96.

52. Perianayagam, M. C. et al. "Defective interleukin-10 synthesis by peripheral blood mononuclear cells among hemodialysis patients" *Blood Purif.* 20.6 (2002): 543-50.
53. Perrey, C. et al. "ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms." *Transpl.Immunol.* 7.2 (1999): 127-28.
54. Powell, M. J. et al. "Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region." *J.Immunol.* 165.1 (2000): 292-96.
55. Pschyrembel, W and H Hildebrandt. *Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch.* 258. Aufl. de Gruyter Berlin. 1998.
56. Rautenberg, P. et al. "Influenza subtype-specific immunoglobulin A and G responses after booster versus one double-dose vaccination in hemodialysis patients." *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* 8.10 (1989): 897-900.
57. Roilides, E. et al. "Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*" *J.Infect.Dis.* 178.6 (1998): 1734-42.
58. Roilides, E. et al. "Interleukin 10 suppresses phagocytic and antihyphal activities of human neutrophils" *Cytokine* 12.4 (2000): 379-87.
59. Rostaing, L. et al. "Ex vivo flow cytometry determination of intracytoplasmic expression of IL-2, IL-6, IFN-gamma, and TNF-alpha in monocytes and T lymphocytes, in chronic hemodialysis patients" *Am.J.Nephrol.* 20.1 (2000): 18-26.

60. Ruiz, P., F. Gomez, and A. D. Schreiber. "Impaired function of macrophage Fc gamma receptors in end-stage renal disease" *N.Engl.J.Med.* 322.11 (1990): 717-22.
61. Rysz, J. et al. "Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis" *Cell Mol.Immunol.* 3.2 (2006): 151-54.
62. Sardenberg, C. et al. "Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function." *Nephrol.Dial.Transplant.* 21.1 (2006): 160-65.
63. Sardenberg, C. et al. "Balance between cytokine production by peripheral blood mononuclear cells and reactive oxygen species production by monocytes in patients with chronic kidney disease." *Ren Fail.* 26.6 (2004): 673-81.
64. Sarnak, M. J. and B. L. Jaber. "Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population." *Kidney Int.* 58.4 (2000): 1758-64.
65. Schaaf, B. M. et al. "Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism" *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 168.4 (2003): 476-80.
66. Siegenthaler, Walter. *Klinische Pathophysiologie*. 8.Aufl. Thieme, Stuttgart, 2001.
67. Tepel, M. et al. "Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis." *Kidney Int.* 58.2 (2000): 867-72.

68. Turner, D. M. et al. "An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter" *Eur.J.Immunogenet.* 24.1 (1997): 1-8.
69. Vanholder, R. et al. "Depressed phagocytosis in hemodialyzed patients: in vivo and in vitro mechanisms." *Nephron* 63.4 (1993): 409-15.
70. Ward, R. A. "Dialysis water as a determinant of the adequacy of dialysis." *Semin.Nephrol.* 25.2 (2005): 102-11.
71. Windsor, W. T. et al. "Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10." *Biochemistry* 32.34 (1993): 8807-15.

7 DANK

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. D. Fliser und Herrn Prof. Dr. med. H. Köhler bedanken, dass ich diese Arbeit im Labor der Nephrologie durchführen durfte.

Des weiteren gilt mein herzlicher Dank Herrn Prof. Dr. med. M. Girndt für die Überlassung des Themas und für seine Geduld bei der wissenschaftlichen Betreuung und der Korrektur der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christof Ulrich, für die zahlreichen anschaulichen, sowie ausführlichen Erklärungen und Gespräche. Zudem hat er sich für die Korrektur viel Zeit genommen und mich, immer und immer wieder, tatkräftig unterstützt.

Für die Arbeit und Unterstützung im Labor, sowie für viele nette Gespräche bedanke ich mich sehr bei Martina Wagner. Des weiteren danke ich allen Mitarbeitern im Labor für die nette Aufnahme und Zusammenarbeit.

Zudem ein grosser Dank meiner Oma Ruth, der nichts zuviel war und die immer Zeit für mich hatte. Dank auch an Benny und Dusty für zahlreiche Stunden mit mir am Computer.

Zum Schluss, möchte ich mich vor allem bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da waren und sind, und mich bei allem, ohne wenn und aber, unterstützt haben und unterstützen.

8 LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Elena Tzigiannis
Geburtsdatum	31. März 1978
Geburtsort	Saarbrücken
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

SCHULBILDUNG

1984 – 1988	Grundschule; Hütschenhausen
1988 – 1990	Sickingen – Gymnasium; Landstuhl
1990 – 1999	Staatliches Heinrich-Heine-Gymnasium; Kaiserslautern

STUDIUM

2000 - 2007	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum des Saarlandes; Homburg
03.2003	Physikum
09.2005	Poster-Präsentation auf dem 36. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie; Saarbrücken
08.2006 – 07.2007	Praktisches Jahr: <ul style="list-style-type: none">• Innere Medizin, Universitätsklinikum des Saarlandes; Homburg (08.2006 - 12.2006)• Neurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes; Homburg (12.2006 - 03.2007)• Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes; Homburg (03.2007 - 07.2007)
11.2007	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

FAMULATUREN

08.2003	Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie; Universitätsklinikum des Saarlandes
09.2003 - 10.2003	Praxis für Orthopädie und Rheumatologie - Dr. med. G. Beige; Neunkirchen
03.2004	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene; Universitätsklinikum des Saarlandes
08.2004 - 09.2004	Innere Medizin II - Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Diabetologie und Ernährungsmedizin; Universitätsklinikum des Saarlandes
03.2005	Klinik für Innere Medizin III - Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin; Universitätsklinikum des Saarlandes
08.2005 - 09.2005	Praxis für Gynäkologie - Dr. med. M. Tzigiannis; Landstuhl
02.2006 - 03-2006	Innere Medizin, St. Johannis – Krankenhaus; Landstuhl

WEITERE TÄTIGKEITEN

1999 - 2003	Abschluss der Ausbildung zum DSB-Übungsleiter / Trainerin-C-Tennis-Wettkampf und Tätigkeit als Tennistrainerin im Jugend- und Erwachsenenbereich
10.2003 – 03.2004	Moniteur in der Anatomie unter Prof. Dr. R. Bock; Universitätsklinikum des Saarlandes
10.2004 – 03.2005	Moniteur in der Anatomie unter Prof. Dr. R. Bock; Universitätsklinikum des Saarlandes

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

Seit 04.2008	Assistenzärztin in der Inneren Medizin im Westpfalz Klinikum Kaiserslautern
--------------	--